

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Triin Truu

***Eschericia coli* 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide tähtsusest**

Bakalaureusetöö

Juhendaja Dr. Aivar Liiv

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1 Ribosoomi üldine iseloomustus.....	6
1.1 Ribosomaalne RNA (rRNA)	6
1.2 23S rRNA domeenid.....	9
1.2 23S RNA domeen V modifikatsioonid.....	12
1.3 Bakteriaalsed modifikatsiooniensüümid ja nende modifikatsioonid 23S rRNA domeenis V	15
1.3.1 Pseudouridiini süntaasid	15
1.3.2 Metüültransferaasid	18
EKSPERIMENTAALOSA.....	22
1 Töö eesmärk	22
2 Materjal ja meetodika.....	23
2.1 <i>E. coli</i> tüved, plasmid ja viirus	23
2.2 Praimerid.....	24
2.3 Söötmed	24
2.4 Puhvrid, ensüümid ja reagensid.....	25
2.5 Aparatuur	25
2.6 <i>E. coli</i> tüvede konstrueerimine	26
2.6.1 Värske bakteriofaag P1 viiruslusaadi valmistamine.....	26
2.6.2 Doonortüvede nakatamine bakteriofaagiga P1 ja viiruslusaadi valmistamine...	26
2.6.3 Transduktsioon	26
2.6.4 Transformatsioon ja plasmidi eemaldamine.....	27
2.7 Koloonia – PCR.....	28
2.8 Ribosoomide fraktsioneerimine sahharoosgradiendi abil	29
2.8.1 Ribosomaalse võrdlusmaterjali saamine erinevatest <i>Escherichia coli</i> tüvedest	29

2.8.2 Rakulüsaadi valmistamine ja ribosoomide eraldamine	29
3 Tulemused ja arutelu	31
3.1 Escherichi coli tüvede MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE::Km$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$) ja MG1655 ($\Delta rluC$ $\Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) konstrueerimine	31
3.1.2 Konstrueeritud <i>E. coli</i> tüved.....	36
3.2 Escherichia coli konstrueeritud bakteritüvede MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) anaüüsimine.....	37
3.2.1 Temperatuuritundlikkuse analüüsimine	37
3.2.2 Konstrueeritud bakteritüvede kasvukiiruse analüüsimine.....	41
3.2.3 Konstrueeritud bakteritüvede MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE$), MG1655 ($\Delta rluC$ $\Delta rlmKL \Delta rluF$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) ribosoomide analüüs	44
KOKKUVÕTE	48
SUMMARY	49
TÄNUSÕNAD.....	50
KASUTATUD KIRJANDUS	51
Artiklid:.....	51
Raamatud:	59
LISAD	60
LISA 1	60
LIHTLITSENTS	61

KASUTATUD LÜHENDID

Amp - ampitsilliin

Brij 58 - polüoksüetüleen(20)palmitraat

bp – aluspaar (*base pair*)

DOC – naatriumdeoksükolaat

dNTP – desoksünukleosiidtrifosfaat

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

FRT – Flp-rekombinaasi sihtmärk järjestus (*Flp recombination target*)

Km – kanamütsiin

LLP – lüüsilahjenduspuhver

MOPS – 3-morfolinopropaansulfoonhape

nt – nukleotiid

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

PTC – peptidüültransferaasne tsenter

rRNA – ribosomaalne ribonukleinhape

TBE – TrisHCl-boorhape-EDTA

U – ühik (*Unit*)

wt – metsiktüüp (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Ribosoom on ribosomaalsetest valkudest ja RNAST koosnev ribonukleoproteiinosake, mis teostab rakkudes valgusünteesi. *Escherichia coli* on üks enamlevinud mudelorganisme ribosoomi struktuuri ja funktsiooni uurimisel. *E. coli* ribosoom koosneb 5S, 16S ja 23S ribosomaalsetest RNAdest ja 54 ribosoomi valgust.

Prokarüootne 23S rRNA sisaldab seitset domeeni. Domeenis V paikneb peptidüültransferaasne tsester, mis on oluline aminohapetevaheliseks peptiidside sünteesiks. 23S rRNA sisaldab ka modifitseeritud nukleotiide – pseudouridiine ja metülatsioone, millest paljud asuvad peptidüültransferaasse piirkonna vahetus läheduses.

Peaaegu 20 aastat tagasi avaldasid Rachel Green ja Harry Noller töö, milles väitsid 23S rRNA domeenis V olevat 80 nukleotiidses piirkonnas, mis on *in vitro* ribosoomi funktsionaalsuse jaoks hädavajalik. See piirkond paikneb domeeni V tsentraalses lingus, kus asuvad enamus domeeni V modifikatsioonid (Green ja Noller, 1996). Modifikatsioonide olemasolu erinevateks põhjendusteks on peetud olulisust ribosoomi assambleerimisel, valgusünteesis ja tundlikkuse vähendamisel antibiootikumidele.

Käesoleva töö kirjanduslikus osas antakse lühiülevaade 23S rRNA domeenidest, domeenis V paiknevatest modifikatsioonidest ning nende seni avastatud funktsioonidest.

Töö eksperimentaalses osas konstrueeritakse *Escherichia coli* mutanttüvesid, milles puudub erinevates kombinatsioonides domeeni V modifikatsioonid. Seejärel analüüsitakse konstrueeritud tüvede ribosomaalset profiili ning fenotüüpe erinevatel temperatuuridel.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1 Ribosoomi üldine iseloomustus

Ribosoomid on universaalselt konserveerunud ensüümid, mis tõlgivad geneetilise info funktsionaalseteks valkudeks. Kõik ribosoomid koosnevad ribosomaalsest RNAST (rRNA) ja ribosoomi valkudest (r-valgud). Bakteriaalse ribosoomi RNA ja valgu suhe on 2:1 ehk rRNA moodustab umbes kaks kolmandikku ribosoomist (Melnikov et al., 2012; Wilson ja Nierhaus, 2007). Prokarüootne ribosoom koosneb kahest erineva suurusega alaühikust: väike 30S alaühik ja suur 50S alaühik. Suure ja väikese alaühiku assotsieerumisel tekib 2.3 MDa bakteriaalne ribosoom ehk 70S partikkel. Subühikute assotsieerumisel on olulised 12 subühikutevahelist silda, mis moodustuvad RNA-RNA, RNA-valk või valk-valk interaktsioonidena (Gao et al., 2003; Yusupov et al., 2001).

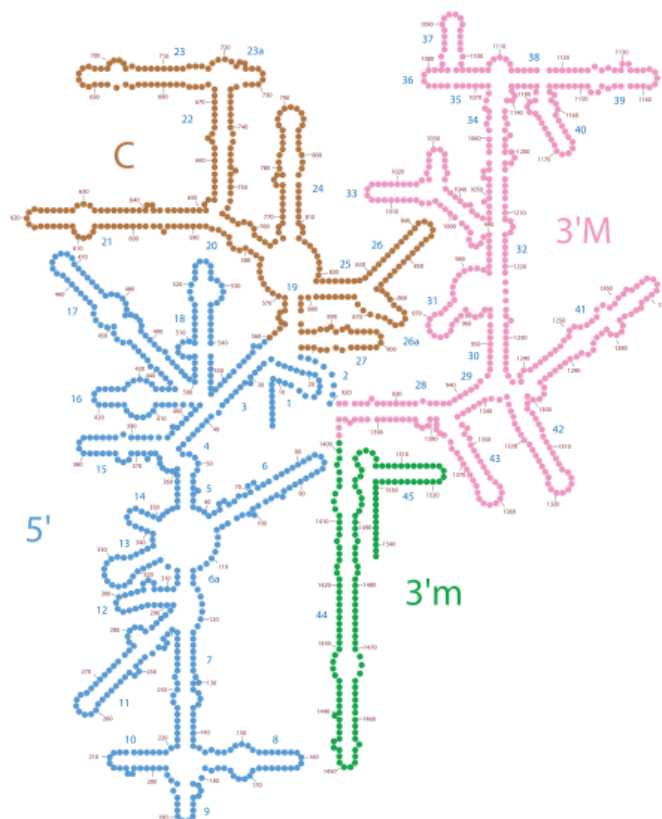
Escherichia coli on üks peamisi mudelorganisme ribosoomi struktuuri ja funktsiooni uurimisel. *E. coli* ribosoom koosneb kolmest erinevast rRNA molekulist ja 54 ribosoomi valgust. Suur subühik koosneb omakorda 23S rRNAST ja 5S rRNAST ning 33 r-valgust (L1-L36) ja väike subühik koosneb 16S rRNAST ning 21 r-valgust (S1-S21) (Melnikov et al., 2012; Wittmann, 1982). Terve ribosoom sisaldab kolme tRNA seondumiskohta. Nendeks on aminoatsüül-tRNA piirkond (*A-site*), peptidüül-tRNA piirkond (*P-site*) ja *exit*-tRNA piirkond (*E-site*) (Selmer et al., 2006). Ribosoomi suur subühik sisaldab peptidüültransferaaset tsentrit, mis koosneb valdavalt 23S rRNAST. 23S rRNA katalüüsib peptiidsidevete sünteesi aminohapete vahel ning seega võib 23S rRNA nimetada ka ribosüümiks. Väike subühik sisaldab dekodeerivat tsentrit, kus laetud tRNA-d loevad ehk dekodeerivad mRNAs sisalduvaid koodoneid (Melnikov et al., 2012).

1.1 Ribosomaalne RNA (rRNA)

E. coli ribosoom sisaldab kolme rRNA molekuli: 23S rRNA (2904 bp) ja 5S rRNA (120 bp) suures alaühikus ning 16S rRNA (1500 bp) väikeses ribosoomi alaühikus. Ribosomaalsed RNAd omavad võtmerolli ribosoomi funktsioneerimisel (Wittmann, 1982). Umbes 50% rRNAST on biheeliksina ning lisaks Watson-Cricki aluspaardumisele esineb ka mittekanoonilisi aluspaardumisi. Näiteks 16S rRNAs on üsna tavaline mittekanooniline paardumine, mis sisaldab adeniini (G-A, A-A või äraspidine Hoogsteen (U-A, C-A)). 23S rRNA on 101 ja 16S rRNA 45 biheeliksit (Wimberly et al., 2000).

Sekundaarstruktuuri alusel saab 16S rRNA jaotada neljaks erinevaks domeeniks. Joonisel 1 on näidatud 16S rRNA 5' domeen, mis moodustab põhiosa kehast (*body*), tsentraalne domeen moodustab platvormi (*platform*), 3' mažoorne domeen moodustab suurema osa peast (*head*)

ja 3' minoorne domeen on osa kehasubühikute kokkupuutepinnal (Noller ja Woese, 1981, Wimberly et al., 2000). Kõiki 16S rRNA domeene on võimalik selgelt eristada nii sekundaarstruktuuril kui 30S subühikus (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). 16S rRNA 3'otsas asub anti-Shine-Dalgarno järjestus, mis paardub mRNA translatsiooni startkoodonist ülevalpool (*upstream*) oleva Shine-Dalgarno (SD-järjestus) järjestusega. mRNA SD-järjestuse seondumine 30S subühikuga on vajalik translatsiooni toimumiseks (Wimberly et al., 2000).

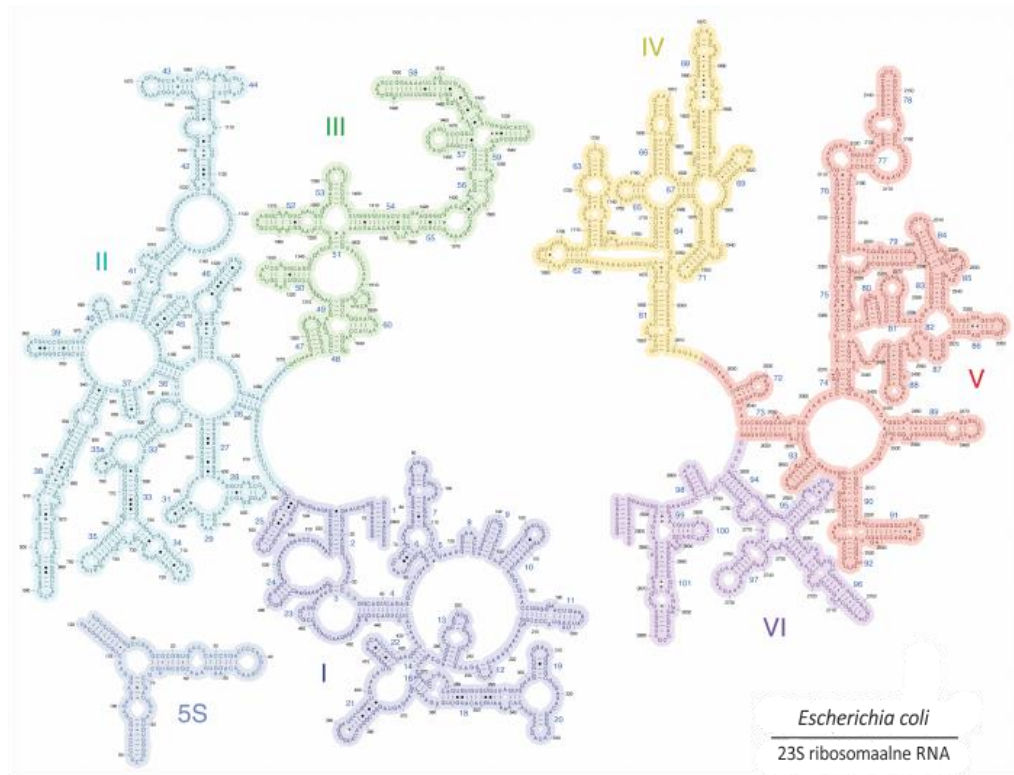


Escherichia coli

16S ribosomaalne RNA

Joonis 1. *Escherichia coli* 16S rRNA sekundaarstruktuur. Joonisel on näidatud tsentraalne domeen (C), 3' mažoorne domeen (3'M), 3' minoorne domeen (3'm) ning 5' domeen (5') (Petrov et al., 2014).

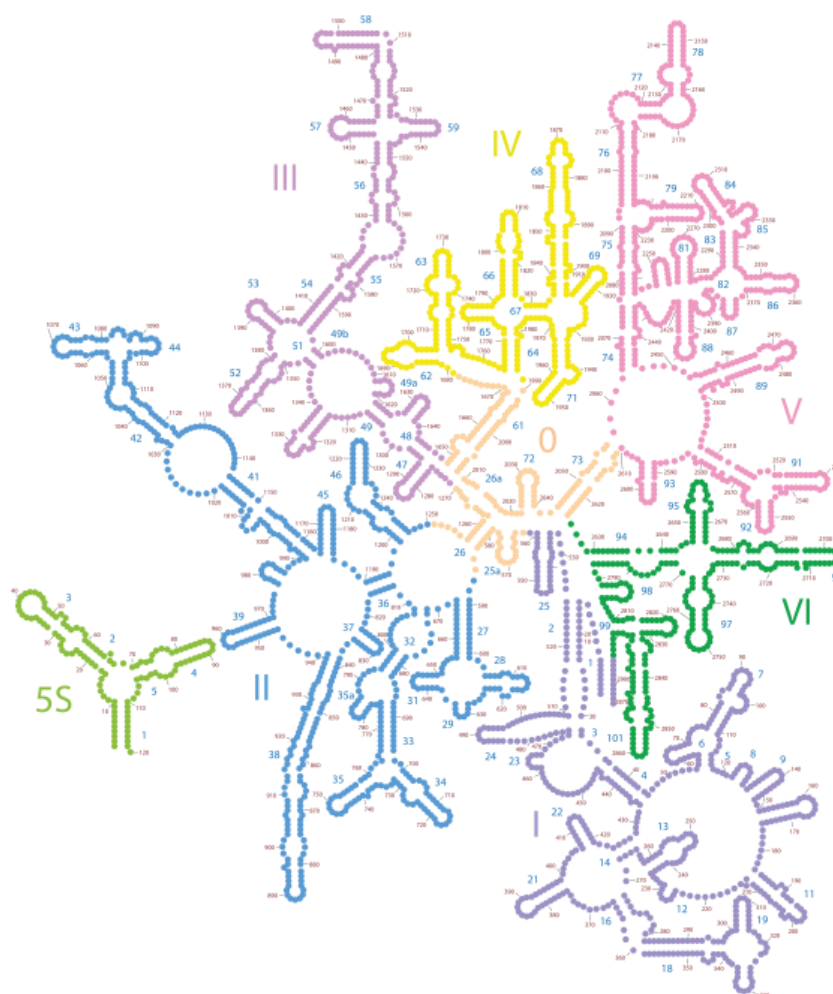
Fülogeneesi järgi tuletatud mudelis on 23S rRNA kuus domeeni (Joonis 2): domeen I, II, III, IV, V ja VI (Noller et al., 1981). Selle mudeli järgi moodustavad kõik kuus domeeni tertsiaarstruktuuris väga assümmeetrilisi struktuure. Domeenid on tihedalt valkude ja iseendaga läbi põimunud ning moodustub üks monoliitne RNA struktuur (Ban et al., 2000).



Joonis 2. *Escherichia coli* fülogeneesi järgi tuletatud 23S rRNA sekundaarstruktuur. Joonisel on näidatud domeenid I, II, III, IV, V, VI ning 5S rRNA (Noller et al., 1981).

Kuid Pertov et al. poolt tuletatud 23S rRNA sekundaarstruktuur põhineb ruumilisel struktuuril (Joonis 3) ja seega sisaldab 50S alaühik kaheksat domeeni. Sellest lähtuvalt sisaldab 23S rRNA sekundaarstruktuur seitset domeeni (domeen 0, I, II, III, IV, V, VI) ja 5S rRNA moodustab ühe domeeni (domeen VIII). Tsentraalne domeen, mida nimetatakse domeen 0, moodustab 23S rRNA keske südamikku ning ülejäänud kuus domeeni hargnevad sellest välja (Petrov et al., 2013).

Erinevalt 30S subühikust pole 50S subühikus võimalik 23S rRNA domeene eristada. Valgud on hajutatud läbi struktuuri ning asetuvad üldjuhul suure subühiku pinnale. Enamjaolt puuduvad L-valgud 23S rRNA regioonidest, mis on primaarse funktsiooni poolest seotud valgusünteesiga: 30S kokkupuutepind ja peptidüültransferaasne aktiivsaht (PTC). L-valkude põhiline ülesanne 50S subühikus tundub olevat 23S rRNA tertsiaarstruktuuri stabiliseerimine (Ban et al., 2000).



Escherichia coli

23S ribosomaalne RNA

Joonis 3. *Escherichia coli* 23S rRNA ruumilise struktuuri alusel tuletatud sekundaarstruktuur. Joonisel on näidatud domeenid 0, I, II, III, IV, V, VI ning 5S rRNA (Petrov et al., 2013).

1.2 23S rRNA domeenid

Domeen I (nt 1-561, 2895-2904) sisaldab heelikseid 1-24 (Petrov et al., 2013) ning on oluline ribonukleoproteiini (RNP) moodustumisel. Domeeni I seob ribosoomivalke L4, L20, L22 ja L24 (Egebjerg et al., 1987; Leffers et al., 1988; Zengel ja Lindahl, 1993), mis on olulised 50S subühiku kokkupakkimisel (Spillmann et al., 1977). Valgu L24 naabruses on valgu L22 seondumisala, mis on kontaktis kõigi kuue domeeniga (Ban et al., 2000; Wilson ja Nierhaus, 2005). Domeen I ei sisalda ühtegi modifikatsiooni.

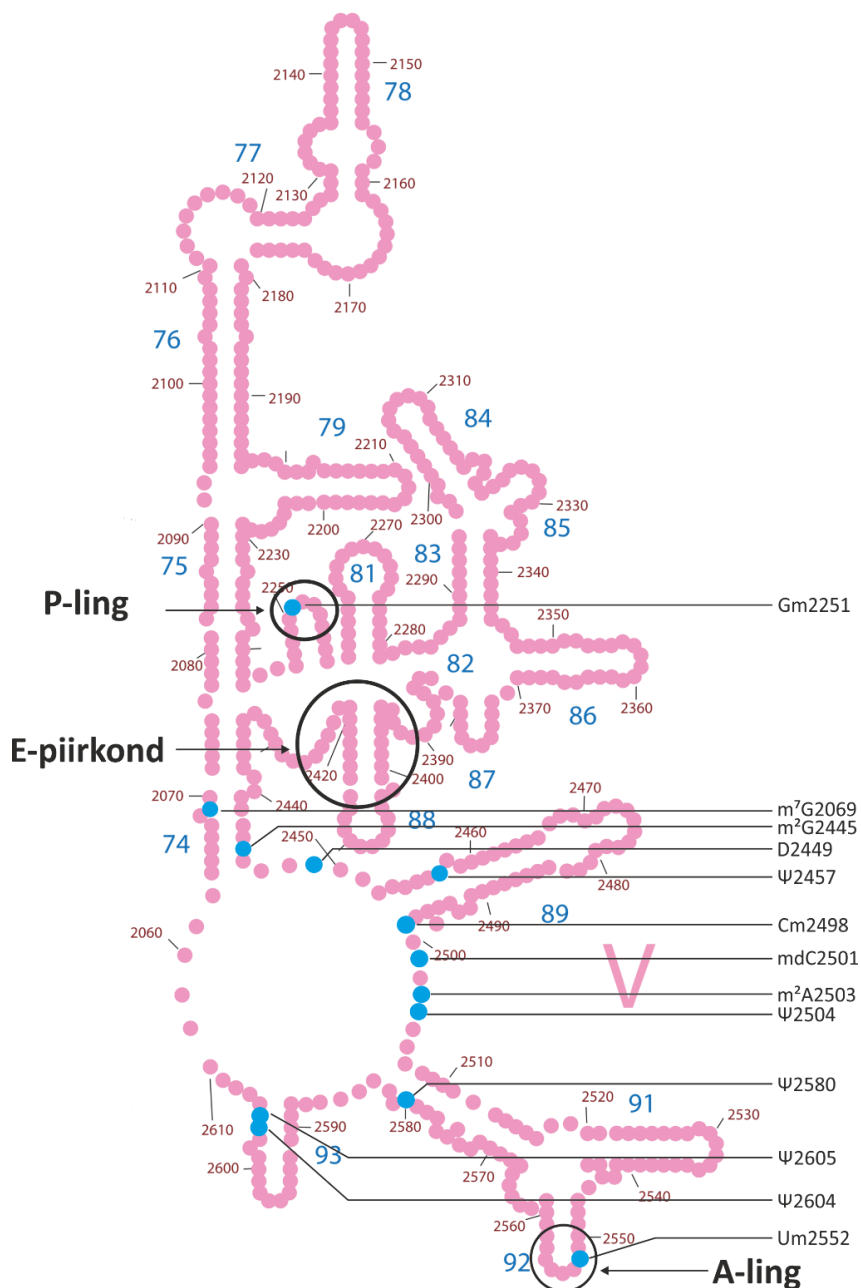
Domeen II (nt 587-1250) on 23S rRNA suurim domeen ning sisaldab heelikseid 25-46 (Petrov et al., 2013). Domeeni II peamiseks funktsiooniks on elongatsioonifaktorite (EF-G ja EF-Tu) sidumine. Domeeniga II seonduv oluline valk on L11. Mutatsioonid L11 valgus või L11 puudumine põhjustab resistentsust tiostreptooni vastu. Tiostreptoon on antibiootikum, mis blokeerib ribosoomi üleminekut pre-translokatsioonilisest olekust post-translokatsioonilisse ning vastupidi. Bakterirakkude näljastressivastuse ehk *stringent response*'i ajal tunneb L11 valk ära deatsüleeritud tRNA A-piirkonnas. Domeen II sisaldab nelja modifitseeritud nukleotiidi: m¹G 745, Ψ 746, m⁵G 747 ja Ψ 955 (Ofengand, 2004; Wilson ja Nierhaus, 2005).

Domeen III (nt 1271-1647) sisaldab heelikseid 47-60 (Petrov et al., 2013) ning moodustab kompaktse globulaarse domeeni. Kõige ulatuslikumad interaktsioonid on domeeniga II, kuid ka domeenidega I, IV ja VI. Erinevalt teistest domeenidest ei ole domeenil III peaaegu üldse kokkupuuted domeeniga V (Ban et al., 2000). Domeen III sisaldab üht modifikatsiooni: m⁶A 1618 (Ofengand, 2004).

Domeen IV (nt 1679-1989) sisaldab heelikseid 61-71 (Petrov et al., 2013) ja moodustab peamiselt 50S subühiku kokkupuutepinna 30S subühikuga. See moodustab suure diagonaalse osa kokkupuutepinnast ning kontakteerub domeenide III ja V partikli selgmises osas. Domeeni IV heeliksid 67 kuni 71 on üks väheseid 23S rRNA regioone, mis pole L-valkudega ulatuslikult stabiliseeritud (Ban et al., 2000). Üks olulisemaid piirkondi domeenis IV on heeliks 69, mis kontakteerub 16S subühikuga, A- ja P-piirkondade tRNAdega ning mitmete translatsioonifaktoritega. Mutatsioonid heeliks 69 lingus inhibeerivad translatsiooni ning põhjustavad defekte 50S subühiku ja 70S ribosoomi moodustumisel (Liiv et al., 2005). Domeen IV sisaldab kuut modifikatsiooni: m²G 1835, Ψ 1911, m⁵Ψ 1915, Ψ 1917, m⁵U 1939 ja m⁵C 1962 (Ofengand, 2004).

Domeen V (nt 2058-2610) (Petrov et al., 2013) on domeenide IV ja II vahele surutud ja paikneb 50S partikli keskel. Domeen V (joonis 4) sisaldab heelikseid 74-93 ning peptidüültransferaasse aktiivsusega piirkonda. Struktuuriliselt võib selle domeeni jaotada kolmeks regiooniks. Esimene piirkond algab heeliksiga 75 ja moodustab heeliksite 76, 77 ja 78 L1-valgu seondumissaidi. Tõenäoliselt osaleb L1 valk deatsüleeritud tRNA eemaldamisel E-piirkonnast. *E. coli* ribosoomid, millest on L1 valk eemaldatud, on polüpeptiidide sünteesil 40%-60% madalama aktiivsusega, kui normaalsed ribosoomid. Sellistes ribosoomides on näidatud peptidüül-tRNA madalamat seondumise aktiivsust ribosoomile. Teine regioon heeliksite 80 ja 88 vahel moodustab tsentraalse mügara ning on kontaktis domeen II ja 5S

rRNaga. Selles piirkonnas paiknevad P-ling, mis seondub peptidüül-tRNaga, ja E-piirkond (heeliks 88 lähipiirkond), mis on seotud tRNA väljumisega ribosoomist. Kolmas regioon heeliks 89 ja 93 vahel ulatub domeen VI-ni ja aitab stabiliseerida ribosoomi elongatsiooni faktorite seondumise piirkonda. Heeliksi 92 ling ehk A-ling on seotud aminoatsüül-tRNA sidumisega. (Ban et al., 2000, Moazed ja Noller, 1989). Domeen V sisaldab kolmeteist modifikatsiooni: m⁷G 2069, Gm 2251, m²G 2445, hU 2449, Ψ 2454, Cm 2498, mdC 2501, m²A 2503, Ψ 2504, Um 2552, Ψ 2580, Ψ 2604 ja Ψ 2605 (Ofengand, 2004; Andersen et al., 2004).



Joonis 4. *Escherichia coli* 23S rRNA domeen V. Joonisel on märgitud A ja P-lingud ning E-piirkond. Lisaks on välja toodud kõik domeenis V asuvad modifikatsioonid.

Domeen VI (nt 2667-2914) sisaldab heelikseid 95-101 (Petrov et al., 2013) ning on 23S rRNA väikseim domeen ja moodustab x-tähe kujulise ala subühiku pinnal L7/L12 haru all (Ban et al., 2000). Domeen VI sisaldab heeliksis 95 sartsiin-ritsiin lingu (SRL) (nukleotiidid G2654–A2665), mis sisaldab pikimat universaalselt konserveerunud rRNA järjestust. SRL on oluline EF-Tu seondumiseks ning EF-G ankurdamiseks ribosoomile erinevate konformatsiooniliste muutuste ajal translokatsiooniprotsessis. Kui ritsiini N-glükosidaasse aktiivsusega eemaldada lingust nukleotiid A2660 või lõigata 23S rRNA-d nukleotiidi G2661 järel RNA-s α -sartsiiniga, siis takistatakse EF-Tu ja EF-G seondumine ribosoomile ja GTPaasne aktiivsus ning blokeeritakse translatsioon (Yamamoto et al., 2014). Sarnaselt domeenile I puuduvad ka domeenis VI modifikatsioonid.

Tsentraalne domeen 0 sisaldab heelikseid 25a, 26, 26a, 61, 72 ja 73, mis on tihedalt üksteisega seotud ja vähem integreerunud ümbritseva rRNA-ga. Domeenil 0 võib olla oluline struktuuriline roll, kuna sisaldab vagu, mis hoiab peptidüültransferaasse tsentri A- ja P-piirkondi üksteisele lähedal. Selles domeenis asub üks modifikatsioon: m⁶A2030 (Petrov et al., 2013).

1.2 23S RNA domeen V modifikatsioonid

Kõikide organismide rRNA sisaldab erinevaid modifitseeritud nukleosiide, mida modifitseeritakse rRNA maturatsiooni käigus posttranslatsiooniliselt (va 5S rRNA). Modifikatsioone saab jagada nelja gruppi (Grosjean, 2005). Esimene grupp on uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks (5'-ribosüül-uratsiil; Ψ), teise gruppi kuuluvad metülatsioonid (süsinikul, primaarsel lämmastikul, tertsiaarser lämmastikul), deaminatsioon (nt. inosiin), reduktsioon (nt dihydrouridiin), tiolatsioon või alkülatsioon (nt isopentülatsioon). Kolmanda grupi moodustavad riboosi 2'-hüdrosüülgrupi metülatsioonid ning neljanda komplekssemad mitmekordsed modifikatsioonid (nt. 5-metüülamino-metüül-2-tiouridiin) (Chow et al., 2007). Kõikide organismide rRNA enamlevinud modifikatsioonid on pseudouridiinid ning alus- või ribosometülatsioonid (Maden ja Hughes, 1997; Decatur ja Fournier, 2002). *E. coli* 23S rRNA sisaldab 25 modifitseeritud nukleotiidi, millest neliteist on metülatsioonid, üheksa pseudouridiinid, üks metüleeritud pseudouridiin, üks dihydrouridiin ning C2501 on osaliselt modifitseeritud nukleotiid (Ofengand, 2004). Enamik 23S rRNA modifikatsioonidest on koondunud PTC piirkonda (Decatur ja Fournier, 2002). Ribosoomi suur subühik on modifikatsioonidest rohkem sõltuvuses kui 30S subühik. *E. coli* 16S rRNA sisaldab 11 modifikatsiooni, kuid nende modifikatsioonide puudumisel on võimalik moodustada *in vitro* funktsionaalne 30S subühik. Suures subühikus aga paikneb domeenis V umbes 80 nukleotiidi pikkune piirkond (nt 2445-2623), millele konstrueeriti *in vitro* analoog

ilma modifikatsioonideta. Selliselt konstrueeritud 23S rRNA ei moodusta *in vitro* funktsionaalset subühikut (Green ja Noller, 1996).

23S rRNA 25 modifikatsioonist 17 ei ole hädavajalikud *in vitro* funktsionaalsuse ja subühiku kokkupakkimise jaoks. Domeen V sisaldab PTC regiooni juures eelnevalt mainitud 80 nukleotiidi pikkust piirkonda (nt 2445-2523), milles sisaldub vähemalt kuus modifikatsiooni. Need võivad olla hädavajalikud funktsionaalse 50S partikli moodustamiseks *in vitro*: m²G2445, D (dihüdrouridiin) 2449, Ψ2457, Cm2498, m²A2503 ja Ψ2504 (Green ja Noller, 1996). Antud piirkonna läheduses paiknevad ka Um2552, Ψ2580, Ψ2604, Ψ2605 (Bügl et al., 2000; Caldas et al., 2000; Conrad et al., 1998; Del Campo et al., 2001; Huang et al., 1998). Lisaks avaldas Andersen et al. 2004. aastal tundmatu osaliselt modifitseeritud nukleotiidi, mis paikneb 80 nukleotiidses piirkonnas positsioonis C2501. See modifikatsioon identifitseeriti hiljuti Havelund et al. poolt kui 5-hüdroksütsütidiin. Sellised 16-De modifikatsioonid on iseloomulikud tRNAle. mdC2501 on praegu teadaolevalt ainus osaline modifikatsioon *E. coli* ribosomaalses RNAs (Andersen et al., 2004; Havelund et al., 2011). Arvatakse, et pesudouridiinid võivad olla olulised katalüüsis (Lane et al., 1992), dihydrouridiinid võivad funktsioneerida konformatsioonilise painduvuse tagamiseks translatsioonis (Kowalak et al., 1995) ja metüleeritud 2'-hüdroksüülrühmad võivad takistada ebavajalike vesiniksidemete interaktsioone. Nende seitsme modifikatsiooni roll partikli kokkupakkimisel või peptiidside sünteesil ei ole teada (Green ja Noller, 1996, Havelund et al., 2011).

Kui võtta arvesse modifikatsioonide, antibiootikumide seondumise ja ribosoomi funktsionaalsete tsentrite asukohad, siis võib eeldada, et ribosoomi funktsionaalsuse tagamisel on erinevad modifikatsioonid seotud rakkude resistentsusega antibiootikumidele (Cundliffe, 1987). Antibiootikumid seonduvad tavaliselt funktsionaalse tähtsusega piirkondadesse ning steeriliselt blokeerivad ribosomaalse aktiivsuse tagamiseks vajalike molekulide seondumise või struktuuride moodustumise (Vester ja Long, 2009). Näiteks tetratsükliinid takistavad tRNA seondumist dekodeerivasse tsentrisse (Brodersen et al., 2000) ja klindamütsiin ning klooramfenikool takistavad tRNA seondumist PTCsse (Schlünzen et al., 2001). Paljud mikrobioloogilise päritoluga antibiootikumid seonduvad sihtmärkraku ribosoomiga ning takistavad valgusünteesi. Üks levinud moodus, kuidas antibiootikume tootvad organismid enesetappu väldivad on spetsiaalsete metüültransferaaside ekspresseerimine. Need modifitseerivad rRNA nukleotiide, kus on antibiootikumide seondumiskohad ning nii takistatakse antibiootikumi seondumist ribosoomile (Cundliffe, 1989; Liu ja Douthwaite, 2002). Modifikatsiooniensüümide geenide omandamine patogeene poolt on üks suurimaid kliinilise resistentsuse tekkepõhjuseid. Kuna funktsionaalne PTC piirkond ribosoomis on

rakkudele eluliselt oluline, on see piirkond ka üheks märklauaks antibiootikumidele. Metülatsioonid on teadaolevalt ainsad RNA modifikatsioonid, mis tagavad rakkudele omandatud antibiootikumide resistentsuse (Douthwaite, Fourmy ja Yoshizawa, 2005). Domeeni V paikneva modifikatsiooni m²A2503 hüpermetüleerimine 2,8-dimetüüladenosiiniks (m^{2,8}A2503) põhjustab resistentsust fenikoolidele, linkosamiididele, oksasolidiinidele, pleuromutiliinidele ja streptogramiin A antibiootikumidele (Long et al., 2006). rRNA modifikatsioonid või nende puudumine võivad rakkude tundlikkust antibiootikumidele mõjutada. Ka loomulike modifikatsioonide puudumine võib mõjutada patogeenide vastuvõtlikkust antibiootikumidele (Johansen et al., 2006; Lazaro et al., 1996; Okamoto et al., 2007). RlmN poolt sünteesitud metülatsiooni (m²A2503) puudumine põhjustab kergelt tundlikkuse suurenemist tiamuliini, hügromütsiini A, sparsomütsiini ja linesoliidi vastu (Toh et al., 2008). *rluC* geeni inaktivatsioonist tulenev pseudouridiini puudumine positsioonis U2504, mis asub domeeni V tsentraalses ringis põhjustab rakkude märgatavat tundlikkuse suurenemist mitmetele antibiootikumidele: tiamuliin, klooramfenikool, klindamütsiin, linesoliid, hügromütsiin A ja sparsomütsiin (Toh ja Mankin, 2008). Seega pseudouridiinide ja metülatsioonide puudumisel või olemasolul on erinevad efektid bakterirakkude antibiootikumide tundlikkusele.

Pseudouridiin on kõige levinum modifikatsioon rRNAs ning paljud pseudouridiinide paiknemise piirkonnad on konserveerunud (Ofengand et al., 2001). Ühed enim konserveerunud pseudouridiinid on 23S rRNA heeliksis 69 (Ψ 1911, Ψ 1915, Ψ 1917), mida sünteesib pseudouridiini süntaas RluD (Sivaraman et al., 2004). rRNA sekundaarstruktuurist lähtudes ei ole pseudouridiinid suvaliselt paigutatud, vaid klasterdunud funktsionaalselt olulistesse piirkondadesse. Ka ruumiliselt vaadelduna on pseudouridiinid kontsentreerunud PTC piirkonda, dekodeerivasse alasse, A-saidi sõrme (*A-site finger*; ASF) regiooni ja piirkondadesse, kus ribosoomi subühikud interakteeruvad (Baudin-Baillieu et al., 2009; King et al., 2003; Liang et al., 2007, 2009; Piekna-Przybylska et al., 2008). Seega võib järeldada, et pseudouridiinid võivad olla olulised translatsiooni efektiivsel toimimisel.

Metüleeritud nukleosiidid rRNAs võivad olla C-, O- või N-metüleeritud. *E. coli* 23S rRNA sisaldab 14 ning 16S rRNA 10 metülatsiooni. Üsna sagedane on guanosiini metülatsioon N2 positsioonis (m²G või N2-metüülguanosiin). Viiest identifitseeritud N2-metüülguanosiinist kolm asub 16S rRNAs (m²G966, m²G1207 ja m²G1516) ning kaks 23S rRNAs (m²G1835 ja m²G2445). 23S rRNAs paiknevatest modifikatsioonidest m²G1835 asub funktsionaalselt väga tähtsas subühikutevaheliste sildade B2b ja B2c piirkonnas ning m²G2445 asub heeliksis 74 peptidüültransferaasse tsentri piirkonnas (B. S. Schuwirth et al., 2005; Yusupov et al., 2001).

m²G2445 on kõrgelt konserveerunud modifikatsioon. Lisaks paikneb heeliks 74 tihedalt pakitud valguvabas ribosoomi piirkonnas (Lesnyak et al., 2006).

Teine oluline tüüp metülatsioon on seotud riboos-2'-hüdrosüülgrupiga (Nm), millest kolm asuvad domeenis V (Gm2251, Cm2498 ja Um2552). Hüdrosüülgrupi metülatsioon eemaldab ühe võimaliku vesiniksideme doonori ning tekib võimalus hüdrofoobseks kontaktiks (Sergiev et al., 2011). Gm2251 paikneb heeliksis 80 ning ei ole oluline ribosoomi maturatsioonis, lisaks ei tekita modifikatsiooni puudumine fenotüübilist efekti võrreldes *wild type* 'iga (Lövgren ja Wikström, 2001). Cm2498 paikneb domeeni V tsentraalsel ringil ning Um2552 asub heeliksis 92 ja osaleb A-lingu moodustumisel. Um2552 on kriitilise olulisusega ribosoomi stabiilsuse tagamisel ning temaga külgnev G2553 on seotud A-saidis t-RNA sidumisega. Um2552 konformatsioonilised omadused A-lingus mõjutavad olulisi tertsiaarseid interaktsioone ribosoomis (Hager et al., 2004; Kim ja Green, 1999).

Alusmetülatsioonid võivad olla seotud spetsiifiliste hüdrofoobsete interaktsioonidega ribosoomis või takistavad kindlaid Watson-Cricki paardumisi, mis võivad limiteerida ribosomaalsete heeliksiste konformatsioonilisi variante (Helm, 2006). Sarnaselt alusmetülatsioonidele võivad riboosi metülatsioonid olla seotud ribosoomi aktiivsuse tagamisega tänu stabiilsuse reguleerimise või erinevate interaktsioonide moodustamisega.

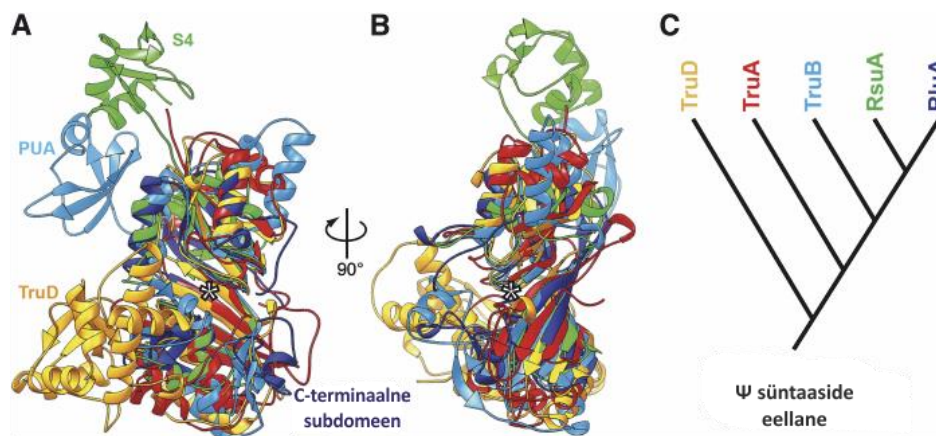
Praeguseks on teada enamus rRNA modifikatsiooniensüümide geene. rRNA pseudouridiinisüntaaside ja metüültransferaaside *knock-out* tüvede fenotüübid võivad varieeruda fenotüübilise efekti puudumisest (Lövgren ja Wikström, 2001) aeglase kasvukiiruseni (Huang et al., 1998; Raychaudhuri et al., 1998).

1.3 Bakteriaalsed modifikatsiooniensüümid ja nende modifikatsioonid 23S rRNA domeenis V

1.3.1 Pseudouridiini süntaasid

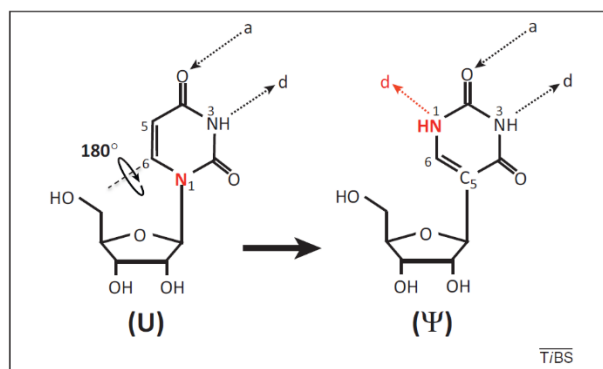
Pseudouridiini süntaase saab grupeerida viide perekonda nende aminohappelise järjestuse põhjal (Kaya ja Ofengand, 2003; Koonin, 1996). Need perekonnad on nimetatud *E. coli* ensüümide järgi RluA, RsuA, TruA, TruB, ja TruD. Kuigi erinevate perekondade ensüümide vahel on minimaalne järjestuslik sarnasus, siis struktuuralsed võrdlused näitavad, et kõik pseudouridiini süntaasid sisaldavad tuumikut, mis on sarnaselt pakitud ja sarnase aktiivsaiidi vaoga (joonis 5). Ψ süntaaside konserveerunud skelett koosneb kaheksaahelalisest β-lehest koos mitmete heeliksiste ja lingudega, mis külgnevad β-lehte poolitava katalüütilise vaoga. Kõigis ensüümperekondades on konserveerunud aspartaadijäägiga ling, mis asub

katalüütilises vaos. RluA perekonda kuuluvad ensüümid RluA, RluC, TruC; RsuA perekonda kuuluvad RsuA, RluB, RluE, RluF; TruA perekonda kuulub TruA; TruB perekonda kuulub TruB ning TruD perekonda TruD (Hamma ja Ferré-D'Amaré, 2006).



Joonis 5. Pseudouridiini süntaaside viie perekonna liikmete struktuuri võrdlus. **(A)** *E. coli* TruD (kollane), TruA (punane), TruB (helesinine), RsuA (roheline) ja RluA (tumesinine) valgustruktuuride superpositsioneerimine. Kõigi ensüümide tuumik on väga sarnane. Otsevaates poolitab aktiivsaite tuumikdomeeni horisontaalselt. Aktiivsaite vagu on näidatud asteriskiga. Näidatud on ka unikaalsed perifeersed domeenid (TruD, PUA, S4 ja C-terminaalne subdomeen). **(B)** Vertikaalteljel 90° roteeritud vaade. **(C)** Süntaaside järjestustel ja struktuuridel põhinev hüpoteetiline evolutsiooniline sugulus (Hamma ja Ferré-D'Amaré, 2006).

Pseudouridiinide süntaasid sünteesivad pseudouridiinid posttranskriptsiooniliselt. Kõigis RNAdes, kus pseudouridiin moodustatakse (rRNA, tRNA, snRNA ja snoRNA) toimub sait-spetsiifiline isomerisatsioon ning RNA ahelas olevate uridiinide modifitseerimiseks on vajalikud RNA ahelates leiduvad sarnased järjestused ja tertsiaarstruktuurid. Uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks toimub energiasõltumatu ensüümkatalüüsi abil (Conrad et al., 1998; Hamma ja Ferré-D'Amaré, 2006; Maden, 1990). Joonisel 6 on näidatud uridiini isomerisatsioon pseudouridiiniks. Lämmastik-süsinik (N1-C1') side uridiini suhkrujäägi ja lämmastikaluse vahel lõhutakse. Vabanenud uratsüül keeratakse 180° mööda N3-C6 telge ning moodustatakse uus süsinik-süsinik (C5-C1') side lämmastikaluse ning suhkrujäägi vahel. Modifikatsiooni tulemusena tekib vesiniksideme doonor N1 positsioonis (Ge ja Yu, 2013).



Joonis 6. Uridiini (U) isomerisatsioon pseudouridiiniks (Ψ). Pseudouridiin saadakse isomerisatsiooni käigus, kus uratsiilalust keeratakse 180° ümber N3-C6 telje ning moodustub uus C5-C1' side. Punasega on märgitud uridiinis lämmastik esimeses positsioonis (N1) ning pseudouridiinis uus vesiniksideme doonor. Märgitud on ka vesiniksideme aktseptor (a) ning vesiniksideme doonor (d) (Ge ja Yu, 2013).

rluC geen kodeerib pseudouridiini süntaasi RluC, mis modifitseerib *in vivo* nukleotiide positsioonides U955, U2504 ja U2580. Ψ955 asub domeeni II heeliksis 39 ning Ψ2504 ja Ψ2580 paiknevad vastavalt domeeni V tsentraalses lingus ja heeliksis 90 (Conrad et al., 1998). Kuigi need kolm uridiini on 23S rRNA primaar- ja sekundaarstruktuuris üksteisest küllaltki kaugel, siis ribosoomis paikneva tertsiaarstruktuuri alusel ei ole Ψ955 teisest kahest RluC poolt modifitseeritavast pseudouridiinist kuigi kaugel (Dokudovskaya et al., 1996). Võib järeldada, et kuigi primaar- ja sekundaarstruktuuris ei ole silmnähtavaid äratundmisjärjestusi, siis tertsiaarstruktuuris võib neid esineda. Ainsad ühised struktuurelemendid, mis neid kolme uridiinijääki ühendavad on neile järgnev guanosinonukleotiid. RluC geeni deleteerimine ja seega kolme pseudouridiini puudumine 23S rRNAs ei põhjusta märgatavat muutust kasvukiiruses nii glükoosirikkal LB kui glükoosovaesel M-9 söötmel temperatuurivahemikus 24°C - 42°C (Conrad et al., 1998). ***rluC*** geeni leidub paljude α-proteobakterite genoomides, siiski ei ole see geen universaalselt konserveerunud, mis viitab, et ilma nende modifikatsioonideta on ribosoomid võimelised efektiivselt funktsioneerima. ***rluC*** geeni inaktivatsioonist tulenev Ψ2504 puudumine põhjustab rakkude vastuvõtlikkust kõigile PTC-seoselistele antibiootikumidele, kuid kõige rohkem klindamütsiinile, linesoliidile ja tiamuliinile. Seega on RluC poolt sünteesitav Ψ2504 oluline PTC piirkonda seonduvate antibiootikumide resistentsuse tagamisel (Toh ja Mankin, 2008).

rluB geen kodeerib pseudouridiini süntaasi RluB, mis katalüüsib U2605 modifitseerimist pseudouridiiniks. Ψ2605 paikneb heeliksis 93 23S rRNA viienda domeeni tsentraalse ringi vahetus läheduses (Del Campo et al., 2001).

rluF geen kodeerib pseudouridiini süntaasi RluF, mis katalüüsib pseudouridiini moodustamist positsioonis U2604. Ψ2604 asub viienda domeeni heeliksis 93 ning külgneb RluB poolt modifitseeritud pseudouridiiniga Ψ2605. RluB ja RluF on homoloogsed pseudouridiini süntaasid ning mõlemad kuuluvad RsaA perekonda. Kui RluB on spetsiifiline U2605, siis RluF on U2604 suhtes selektiivne ja võib vähesel määral modifitseerida ka U2605. RluB ja RluF domeenide struktuurid on samad, kuid erinevus on N- ja C-terminustes umbes neljas aminohappejäägis, mis võivad seletada erinevusi spetsiifikas. RluF sisaldab katalüütiliselt vajalikku konserveerunud aspartaati positsioonis 107 ning RluB positsioonis 110. Nii RluB kui RluF ei ole *in vivo* hädavajalikud funktsionaalse ribosoomi pakkimiseks ning lisaks ei omanud RluB ja RluF topeltdeletsiooniga tüvi *wild type* tüvest erinevat fenotüübilist efekti vedelas LB söötmes temperatuurivahemikus 25°C - 42°C (Czudnochowski et al., 2014; Del Campo et al., 2001). Kuid kuna Ψ2604 on konserveerunud erinevate liikide rRNAs (Del Campo et al., 2001), siis võib oletada, et sellel pseudouridiinil on oluline roll ribosoomi funktsioneerimisel. RluB deletsiooniga tüves akumulatuuruvad vabad 30S ja 50S partiklid ning suhteliselt väheneneb 70S partiklite ning polüsoomide osakaal (Jiang et al., 2007). RluB ja RluF sünteesivad vastavalt Ψ2605 ja Ψ2604 ribosoomi varajases assambleerumisjärgus (Siibak ja Remme, 2010). RluF peab pseudouridiini sünteesima enne ribosoomi täielikku assambleerumist, kuna hiljem pole U2604 piirkond ensüümile kättesaadav (Alian et al., 2009).

RluE kuulub RsaA süntaaside perekonda ning katalüüsib pseudouridiini sünteesi positsioonis U2457. RluE on võimeline *in vitro* kasutama substraadina 23S rRNA-d. Reaktsioone 23S rRNA fragmentide ja Ψ2457-vaba 50S subühikuga pole testitud. *In vivo* substraat on teadmata. *rluE* nullmutandil puudub kasvudefekt (Del Campo et al., 2001).

1.3.2 Metüültransferaasid

rlmB geen kodeerib metüültransferaasi RlmB, mis katalüüsib 2'-O-metüülatsiooni universaalselt konserveerunud G2251 positsioonis, mis asub P-lingus. *rlmB* deletsiooniga tüves puudub Gm2251 ning *wild type* tüve (MW245) ja Δ *rlmB* mutanttüve (MW244) fenotüüpides ei avastatud erinevusi LB-söötmele temperatuurivahemikus 21°C - 44°C. Samuti ei tuvastatud erinevusi ka konkurentsikatses pärast kuut tsüklit ehk üle 120 rakujagunemise. Lisaks ei leitud erinevusi ka ribosoomi subühikute, 70S partiklite ja polüsoomide kogustes. Ka ribosoomi maturatsiooni analüüsimiseks tehtud katsetest (ribosoomi assambleerumise kineetika *pulse-labeling* meetodil, ribosoomi ja subühikute eraldamine sahharoosi gradiendi abil) ei leitud erinevusi *wild type* ja mutandi vahel, mis tõttu võib järeldada, et RlmB ei ole oluline *E. coli* ribosoomide maturatsioonil. Samas ei saa välistada võimalust, et Gm2251 ei

oma tähtsust kontrollitust erinevates tingimustes. *S. cerevisiae* RlmB analoog Pet56p on hädavajalik mitokondriaalse suure subühiku maturatsioonil ning funktsioon on sõltumatu metüültransferaasest aktiivsusest. Võrreldes RlmB-ga on Pet56p-l N-terminaalses osas 143 aminohappeline pikendus. Arvatavasti võib Pet56p maturatsioonifunktsioon peituda selles valgupiirkonnas, mis võib ka selgitada asjaolu, et RlmB ei osale *E. coli* ribosoomi maturatsioonil (Lövgren ja Wikström, 2001; Sirum-Connolly ja Mason, 1993). Vaatamata funktsiooni puudumisele ribosoomi maturatsioonil võib RlmB osutada vajalikuks antibiootikumide resistentsuse tagamisel. RlmB on kohati järjestuselt sarnane kahe *Streptomyces* liigi 2'-O-metüültransferaasile, mis tagavad ribosoomile resistentsuse tiostreptooni vastu (Thompson ja Cundliffe, 1980).

RlmE (RrmJ/FtsJ) metüleerib 23S rRNA universaalselt konserveerunud nukleotiidi U2552 riboosi 2'-OH gruppi moodustades Um2552. Um2552 paikneb viienda domeeni peptidüültransferaases tsentris. Um2552 külgnab alustega, mis seonduvad A-lingus tRNAga ning mutatsioonid selles piirkonnas mõjutavad translatsiooni täpsust (Caldas et al., 2000; Moazed ja Noller, 1989; O'Connor ja Dahlberg, 1993). Mitmeid RlmE homolooge on leitud eubakterites, arhedes ja eukarüootides, kuid vähesed täielikult järjestatud organismidest kodeerivad RlmE homoloogi. Samas inimese X-kromosoomi poolt kodeeritud valk JM on 35% ulatuses identne RlmE-ga, mis viitab, et mõnedel kõrgematel organismidel võib rRNA metüülatsioon toimuda *E. coli* RlmE ensüümiga lähedalt seotud ensüümi poolt. RlmE on *in vitro* aktiivne ribosoomis ja 50S subühikus, kuid ei modifitseeri vabu rRNAid, mis viitab, et ensüümi loomulikuks substraadiks on ribosoomid või pre-ribosomaalsed partiklid (Bügl et al., 2000; Caldas et al., 2000). RlmE puudumine rakus põhjustab kasvudefekti temperatuuridel 30°C - 43°C. Ka ribosoomiprofiilis on näha muutusi. Kui tüüpilisel *wild type* tüvel on enamasti 70S ribosoomi palju ning vähe 50S ja 30S subühikuid, siis *ΔrlmE* ribosoomiprofiil näitab suurtes kogustes vabu subühikuid ning väheses koguses 70S partikleid, mis viitab, et RlmE on oluline ribosoomi assambleerumisel või stabiliseerimisel (Bügl et al., 2000).

rlmKL geenilt kodeeritakse metüültransferaasi RlmKL, mis metüleerib guanosüünnukleotiidi positsioonides G2445 ja G2069. Mõlemad modifitseeritavad nukleotiidid asuvad 23S rRNA heeliksis 74. RlmKL on fuseerunud kahe aktiivtsentriga metüültransferaas. RlmK metüleerib G2069 seitsmendal positsioonis ning saadakse 7-metüülguanosiin (m^7G2069) ning RlmL metüleerib G2445 teisel positsioonis ning saadakse 2-metüülguanosiin (m^2G2445) (Kimura et al., 2012; Lesnyak et al., 2006). N-terminaalses osas asub RlmL ning C-terminuses RlmK, mille olemasolu suurendab RlmL aktiivsust m^2G2445 moodustamisel. Lisaks on RlmKLil helikaasne aktiivsus heeliks 74 suhtes, mis

soodustab m⁷G2069 ja m²G2445 üheaegset sünteesi (Kimura et al., 2012). RlmKL struktuurilised karakteristikud on veel teadmata, kuna ensüüm on ebatavaliselt suur – üle 700 aminohappe ning kompleksne, moodustades vähemalt neli erinevat domeeni. RlmKLi ortoloogid on olemas peaaegu kõigil bakteritel. Gammaproteobakterite hulka kuuluvatest bakteritest on leitud pea täispikad ortoloogid ning nagu *E. coli*l on paljudel neist RlmKL fuseerunud ensüüm (Wang et al., 2012). m²G2445 on erinevate liikide ribosoomi suures subühikus kõrgelt konserveerunud modifikatsioon ning selle puudumine aeglustab raku kasvukiirust. *In vitro* ei ole assambleerunud 50S subühikud ensüümile substraadiks, kuid rekombinantne RlmKL on võimeline modifitseerima SAM olemasolul vaba rRNA-d (Lesnyak et al., 2006). *In vitro* modifitseerib RlmKL 23S rRNA ribosoomi assambleerimise varajases järgus (Siibak ja Remme, 2010).

RlmM katalüüsib *E. coli* 23S rRNA 2'-O-metülatsiooni positsioonis C2498.

Puhastatud RlmM valk on *in vitro* võimeline modifitseerima vaba 23S rRNA-d, kuid mitte 70S ribosoomi või 50S subühikuid. *In vivo* on näidatud, et RlmM katalüüsib C2498 metülatsiooni 50S subühiku kokkupakkimise järgus, kuid modifikatsiooni piirkond pole ensüümile kättesaadav valminud 50S subühikus (Punekar et al., 2012; Purta et al., 2009; Siibak ja Remme, 2010). Seega saab järeldada, et RlmM modifitseerib C2498 ribosoomi pigem keskvarajases maturatsioonifaasis. Metülatsiooni toimumiseks on vajalik metüülrühma doonor SAM. $\Delta rlmM$ tüvi on veidi aeglasema kasvuga kui *wild type* tüvi (BW25113) 37°C juures LB vedelsöötmele, kuid erinevus on piisavalt väike, et mõõtmisviga arvestades ei ole see statistiliselt oluline. Konkurentsikatsetes leiti, et võrreldes *wild type* tüvega on mutanttüvi väiksema fitnessiga (Purta et al., 2009).

RlmN on duaalse spetsiifilisusega ensüüm, mis katalüüsib adenosinnukleotiidi A2503 C2 positsioonis 2-metüüladenosiiniks (m²A2503) ning tRNA m²A 37 positsioonis (Benítez-Páez et al., 2012; Toh et al., 2008). A2503 paikneb *exit*-tunneli alguses (Ban et al., 1998; Harms et al., 2001; Schuwirth et al., 2005; Selmer et al., 2006). Lisaks paikneb m²A2503 üsna lähedal mitmete antibiootikumide seondumipaikadele, mille sihtmärgiks on PTC. Nendeks antibiootikumideks on klindamütsiin, karbomütsiin, streptogramiin A, anisomütsiin ja linesoliid (Hansen et al., 2002; Schlünzen et al., 2001; Tu et al., 2005). Mutatsioonid A2503 piirkonnas annavad resistentsuse klooramfenikoolile ning streptogramiinile (Porse ja Garrett, 1999; Vester ja Garrett, 1988). A2503 hüpermetülatsioon 2,8-dimetüüladenosiiniks põhjustab *E. coli* ja stafülokokkidel resistentsust mitmete PTC regiooni seonduvate antibiootikumide vastu (Kehrenberg et al., 2005; Long et al., 2006). *rlmN* geeni deletsioon ei mõjuta LB söötmele rakkude kasvukiirust võrreldes *wild type* tüvega (BW25113), kuid sarnaselt $\Delta rlmM$

mutanttüvele vähenes ka $\Delta rlmN$ tüve fitness võrreldes *wild type*'iga. m²A2503
modifikatsiooni puudumine põhjustas tundlikkuse suurenemise tiamuliini, hügromütsiin A ja
sparsomütsiini vastu (Toh et al., 2008).

EKSPERIMENTAALOSA

1 Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas on võimalik konstrueerida *Escherichia coli* tüve, milles puuduvad kõik 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid. Sellest lähtuvalt püstitati hüpotees, mille kohaselt on võimalik konstrueerida *Escherichia coli* tüvi, kus puuduvad kõik 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid.

Probleemi lahendamiseks konstrueeritakse selliseid *E. coli* tüvesid, kus erinevates variatsioonides on deleteeritud 23S rRNA d modifitseerivate modifikatsiooniensüümide geenid.

2 Materjal ja metoodika

2.1 *E. coli* tüved, plasmiid ja viirus

Eksperimentide läbiviimiseks kasutati järgmisi *E. coli* tüvesid:

Tüve nimi	Genotüüp	Allikas
MG1655	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1	Blattner et al., 1997
MG1655 (Δ <i>rluC</i>)	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1 Δ <i>rluC</i> 753	M. Leppiku kingitus
JW3982-1	F-, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, Δ <i>rluF</i> 789::kan, <i>hsdR</i> 514	Baba et al., 2006
JW3146-2	F-, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ -, Δ <i>rrmJ</i> 786::kan, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Baba et al., 2006
JW0931-1	F-, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ -, Δ <i>rlmL</i> 764::kan, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Baba et al., 2006
JW2501-1	F-, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ -, Δ <i>yfgB</i> 763::kan, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Baba et al., 2006
JW2777-1	F-, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ -, Δ <i>ygdE</i> 733::kan, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Baba et al., 2006

E. coli tüve MG1655 Δ *rluC* valmistas Margus Leppik PhD (TÜMRI). Keio kollektsiooni tüved (JW3982-1, JW3146-2, JW0931-1, JW2501-1, JW2777-1) saadi kingitusena T. Tensoni laborist (TÜTI).

Escherichia coli tüvede transformeerimiseks kasutati plasmidi pCP20 (FLP⁺, λ I857⁺, λ *p_R* Rep^{ts}, Amp^R, Cam^R) (Cherepanov ja Wackernagel, 1995, Datsenko ja Wanner, 2000).

Transduktsiooni läbiviimiseks kasutati bakteriofaagi P1 (Sternberg, 1990).

2.2 Praimerid

Praimeri nimi	5'→3' järjestus
RluC DIR	GGATGGACACGGAAACGGC
RluC REV	CGCTAATCGCGCTGTGTCAG
RlmE DIR	GCTTGAGCGGATGTGCCAGAC
RlmE REV	GCACAACGGCAATGACCAGC
RlmKL DIR	GTTTGGCCCTGGGTTATGCTCG
RlmKL REV	GCCGTTGCGGCCACCAGAC
RlmN DIR	CAAACGTGGCATCCGTGCGCC
RlmN REV	TTGCATCGTTACATACTGCC
RluF DIR	GCACATTGCTTCTGGAAAGTG
RluF Rev	CAATCAACGCCTGAGATTTTC
RlmM DIR	CTTTATTGCCTGGCGCTGTCC
RlmM REV	GGAAGCCCGCATCGGGCATC

2.3 Söötmed

Söötme nimetus	Koostis	Allikas
2xYT vedelsööde	1,6% trüpton, 1% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl	Sambrook ja Russell, 2001
Luria-Betani (LB) agarsööde	1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar	Bertani, 1951
MOPS minimaal - vedelsööde	1xMOPS soolad, 0,2% glükoos, 1,32mM K ₂ HPO ₄ , 0,2µg/ml tiamiin	Neidhardt et al., 1974

Söötmetele lisati vajadusel vastavalt bakteritüve resistentsusele antibiootikumi kanamütsiin (Km) lõppkontsentratsioonis 25 µg/ml. FLP rekominatsioon viidi läbi LB-Amp tardsöötmele, kus ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsioon oli 100 µg/ml.

2.4 Puhvrid, ensüümid ja reagentid

Nimetus	Koostis
Puhver RF1	1,2% RbCl, 0,99% $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,15% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 30mM KAc (pH=7,5), 10,5% glütserool
Puhver RF2	10mM MOPS, 0,12% RbCl, 1,1% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 15% glütserool
10x PCR puhver	750mM TrisHCl pH 8.8, 200mM NH_2SO_4 , 0,1% tritonX 100, 5% ficoll 400, 10 mM tartasiin
1x TBE puhver	90 mM Tris, 90 mM boorhape, 1 mM EDTA, (10x TBE puhvri pH 8,3)
LP lüüsipuhver	20mM Tris (pH=7,5), 100mM NH_4Cl , 10mM MgOAc , 16% (w/v) sahharoos, 6mM β -merkaptotetanool
Lüüsilahjenduspuhver LLP	20mM Tris, 60mM KCl, 60mM NH_4Cl , 12mM MgOAc , 6mM β -merkaptotetanool

Taq DNA polümeraas oli lahke kink Prof. J. Sedmanilt (Tartu Ülikool). Lüsotsüüm on firmalt AppliChem, Dnase I firmalt Amresco, nukleotiidid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) firmalt MBI Fermentas, Brij 58 ja DOC firmalt Sigma – Aldrich, β -merkaptotetanool firmalt Calbiochem. Marker GeneRuler 1kb DNA Ladder firmalt MBI Fermentas.

2.5 Aparatuur

Vedelkultuure inkubeeriti loksutis 37 °C juures (rpm 180) ning tardsöötmeid Heraeus ja Sanyo inkubaatorites. Kultuuride ja lahuste optilised tihedused mõõdeti Eppendorf BioPhotometer spektrofotomeetriga. Lahuste ja kultuuride kiireks ja intensiivseks segamiseks kasutati Vortex Genie2. Lauatsentrifuugidest kasutati Heraeus fresco ja Heraeus pico. PCR teostamiseks kasutati Biometra UNO II. Geelelektroforeesi läbiviimiseks kasutati Bio-Rad Laboratories PowerPac basic ja PowerPac HC masinaid ning Biometra Compact XS/X ja M horisontaalseid elektroforeesisüsteeme. Sahharoosigradiendi formeerimiseks kasutati ühendatud anumate põhimõttel töötavat gradiendisegajat. Suuremas koguses rakukultuuride kogumiseks kasutati Sorvall RC5B plus fuugi (rootor Sorvall GSA). Rakkude lüüsimine detergentidega tehti LMI intelli-mixer rotaatorsegajal. Eraldatud ribosoomid fraktsioneeriti Beckman Coulter L-90K ultratsentrifuugis (rootor SW-28) ning visualiseeriti GE Healthcare Monitor UVis-920 läbivoolu-spektrofotomeetri, Pharmacia Biotech peristaatilise pumba ja

LKB Bromma 2210 recorder isekirjutaja abil. Konstrueeritud tüvede kasvukiiruste mõõtmiseks kasutati mikroplaadilugejat Tecan Infinite M200 Pro.

2.6 *E. coli* tüvede konstrueerimine

2.6.1 Värske bakteriofaag P1 viiruslüsaadi valmistamine

LB tardsöötmelelt inokuleeriti üks MG1655 koloonia 2 ml 2xYT vedelsöötmesse. Üleöökuultuurist valmistati 10x lahjendus 2 ml 2xYT vedelsöötmesse ning lisati CaCl₂ lõppkontsentratsiooniga 5 mM. Kultuuri inkubeeriti loksutis 37 °C juures kuni OD₆₀₀ ≈ 0,6 ning nakatati 100 µl bakteriofaag P1 lahusega. Seejärel inkubeeriti rakke 4 – 5 h loksutis 37 °C juures ning moodustunud viiruspartiklid eraldati kloroform meetodil. Bakteriofaagiga P1 nakatatud *E. coli* rakkudele lisati kloroform lõppkontsentratsiooniga 10% - 15%. Rakkude lüüsumise efektiivuse tõstmiseks segati kultuuri Vortexiga. Lüüsunud rakud sadestati lauatsentrifuugiga 13000 rpm 3 min. Supernatant eraldati uude tuubi ning töötlust kloroformiga korraldati. Saadud viiruslüsaati säilitati 4 °C juures.

2.6.2 Doonortüvede nakatamine bakteriofaagiga P1 ja viiruslüsaadi valmistamine

LB+Km (25µg/ml) tardsöötmelelt inokuleeriti kahes korduses üks *E. coli* tüvi (JW3982-1, JW3146-2, JW0931-1, JW2501-1, JW2777-1) 2 ml 2YT vedelsöötmesse, millele lisati Km (lõppkontsentratsioon 25µg/ml). Üleöökuultuuridest tehti 10x lahjendused 2 ml 2xYT vedelsöötmesse, millele lisati CaCl₂ lõppkontsentratsiooniga 5 mM ja rakke inkubeeriti loksutis kuni OD₆₀₀ oli 1,1-1,2. Seejärel lisati ühele kultuurile 100 µl ja teisele 50 µl värsket bakteriofaag P1 (MG1655) lahust ning kultuure inkubeeriti loksutis 4 – 5 tundi. Viiruspartiklid eraldati rakkudest kloroform meetodiga (ptk. 2.7.1). Valmistatud bakteriofaagide P1 (JW3982-1), P1 (JW3146-2), P1 (JW0931-1), P1 (JW2501-1), P1 (JW2777-1) lüsaadid kasutati kohe katsetes ning edaspidiseks ei talletatud.

2.6.3 Transduktsioon

Retsipienttüve ettevalmistamiseks inokuleeriti kahes korduses üks *E. coli* koloonia [MG1655 (*ΔRluC*), MG1655 (*ΔRluC ΔRlmKL*), MG1655 (*ΔRluC ΔRlmKL ΔRluF*), MG1655 (*ΔRluC ΔRlmKL ΔRlmN*) või MG1655 (*ΔRluC ΔRlmKL ΔRlmN*)] üleöö 2 ml 2xYT vedelsöötmes. Üleöökuultuurist tehti 40x lahjendus 2 ml 2xYT vedelsöötmesse ning kultuuri inkubeeriti loksutis kuni OD₆₀₀ ≈ 2. Seejärel fuugiti rakud 4000 rpm juures 5 minutit, eemaldati supernatant ja rakke suspendeeriti 500 µl 2xYTs koos 10 mM CaCl₂ ja 5mM MgCl₂. Retsipienttüve nakatamiseks lisati 100 µl-le kultuurile järgmise skeemi alusel valmistatud P1 viiruslüsaati ja/või 2xYT vedelsöödet.

Retsipienttüve nakatamise skeem:

Katse number	P1 lüsaat (µl)	Retsipienttüvi (µl)	2xYT (µl)
N1	100	100	0
N2	50	100	50
N3	10	100	90
N4	100	0	100
N5	0	100	0
N6	100	100	0
N7	50	100	50
N8	10	100	90
N9	100	0	100
N10	0	100	0

Peale retsipienttüve nakatamise algust inkubeeriti rakke loksutamata 37 °C juures 30 minutit. Viirusinkubatsioon peatati naatriumtsitraatiga (lõppkontsentratsioon 0,3M pH 5,5). Seejärel lisati rakkudele 1 ml 2xYT söödet ning inkubeeriti 37 °C juures üks tund. Pärast inkubatsiooni fuugiti rakke lauafuugiga 4000 rpm juures 5 minutit ja rakkude sadet pesti kaks korda 1 ml 2xYT söötmega. Rakud suspendeeriti 100 µl 2xYT söötmes, millele lisati naatriumtsitraati lõppkontsentratsiooniga 100mM ja pH 5,5. Rakud külvati LB+Km (25 µg/ml) tardsöötmele ja inkubeeriti kuumakapis 37 °C juures üleöö.

2.6.4 Transformatsioon ja plasmidi eemaldamine

LB+Km (25 µg/ml) tardsöötmetelt inokuleeriti kahes korduses üks *E. coli* [MG1655 (*ΔrluC ΔrlmE::kan*) või MG1655 (*ΔrluC ΔrlmKL::kan*) või MG1655 (*ΔrluC ΔrlmKL ΔrlmN::kan*) või MG1655 (*ΔrluC ΔrlmKL ΔrluF::kan*) või MG1655 (*ΔrluC ΔrlmKL ΔrlmN ΔrlmM::kan*)] koloonia 2 ml 2xYT+Km (25 µg/ml) vedelsöötmesse ning inkubeeriti loksutis 37 °C juures kuni OD₆₀₀ ≈ 0,6. Seejärel jahutati rakud jääl 15-30 minutit ning koguti lauafuugiga 3000 rpm 5 minutit 4 °C juures. Rakkudelt eemaldati sööde, suspendeeriti 1 ml puhvis RF1 ja inkubeeriti 15-20 minutit. Rakud fuugiti uuesti, eemaldati supernatant ning suspendeeriti 100 µl puhvis RF2. Kompetentsetele rakkudele lisati plasmidi pCP20. Transformeerimine viidi läbikuumasoki meetodil. Rakke hoiti 20-30 minutit jääl ning seejärel 1 minut 42 °C juures. Rakkudele lisati 2 ml 2xYT söödet ning turgutati 1h 37 °C juures. Transformeeritud rakud

koguti kokku lauafuugiga 4000 rpm 5 minutit, suspendeeriti 100 µl 2xYT vedelsöötmes, FLP rekombinatsioon viidi läbi LB+Amp (100µg/ml) tardsöötmele üleöö 30 °C juures.

pCP20 eemaldamiseks rakkudest inokuleeriti LB+Amp (100µg/ml) tardsöötmele kahes korduses üks *E. coli* koloonia [MG1655 (*ΔrluC ΔrlmE*, pCP20), MG1655 (*ΔrluC ΔrlmKL*, pCP20), MG1655 (*ΔrluC ΔrlmKL ΔrlmN*, pCP20), MG1655 (*ΔrluC ΔrlmKL ΔrluF*, pCP20) või MG1655 (*ΔrluC ΔrlmKL ΔrlmN ΔrlmM*, pCP20)] ning külvati paralleelselt nii LB, LB+Km (25 µg/ml) ja LB+Amp (100µg/ml) tardsöötmele. Rakke inkubeeriti kuumakapis 37 °C juures üleöö. Õnnestunud transduktsiooni, transformatsiooni ja plasmidi eemaldamise järel moodustusid *E. coli* kolooniad ainult LB tardsöötmele.

2.7 Koloonia – PCR

PCRi läbiviimiseks lüüsi üks *E. coli* koloonia 10 µl ddH₂O-s 10 minuti jooksul 95 °C juures. Proovile lisati 15 µl reaktsioonisegu ning lõppmahuks kujunes 25 µl. Reaktsioonisekus kasutati 10x PCR puhvrit, 2 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl₂, nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) lõppkontsentratsiooniga 0,2 mM, termoresistentset *Thermus aquaticus*'e Taq DNA polümeraasi lõppkontsentratsiooniga 0,2 U/µl ning 15 pmol kumbagi praimerit (*direct* ja *reverse*).

Reaktsioonisegu koostis:

Reaktsioonisegu	1 reaktsiooni maht
MQ H ₂ O	7 µl
10x PCR puhver	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
Taq DNA polümeraas (5U/µl)	1 µl
Praimer (<i>dir</i>)	15 pmol
Praimer (<i>rev</i>)	15 pmol
KOKKU	15 µl

PCR programm :

Etapp		Temperatuur	Aeg (sek)	Tsüklite arv
1	Algne denaturatsioon	94 °C	180	1
2	Denaturatsioon	94 °C	30	32
3	Oligote seondumine	57 °C	40	
4	Elongatsioon	73 °C	120	
5	Lõplik elongatsioon	73 °C	420	1

Geenide *rluC*, *rluF*, *rlmE*, *rlmKL*, *RlmN*, ja *rlmM* olemasolu või puudumist visualiseeriti geelelektroforeesiga. Segu kanti 1%-lisele etiidiumbromiidi sisaldavale agarosgeelile 1x TBE puhvis. Elektroforees viidi läbi 110V juures 45 minuti jooksul. PCR fragmentide pikkuse määramiseks kasutati võrdlusena makerit GeneRuler 1kb DNA Ladder (0,5 µg/µl). Marker sisaldas DNA fragmente pikkusega 20000 nt, 10000 nt, 7000 nt, 5000 nt, 4000 nt, 3000 nt, 2000 nt, 1500 nt, 1000 nt, 700 nt, 500 nt, 400 nt, 300 nt, 200 nt ja 75 nt. Geelil olevate PCR fragmentide UV-valguses pildistamiseks kasutati UVIPro programmi.

2.8 Ribosoomide fraksioneerimine sahharosgradiendi abil

2.8.1 Ribosomaalse võrdlusmaterjali saamine erinevatest *Escherichia coli* tüvedest

LB tardsöötmetelt inokuleeriti üks *E. coli* [MG1655(*ArluC*), JW3146-2, MG1655 (Δ *rluC* Δ *rlmE::Km*), MG1655 (Δ *rluC* Δ *rlmKL*), MG1655 (Δ *rluC* Δ *rlmKL* Δ *rluF*), MG1655 (Δ *rluC* Δ *rlmKL* Δ *rlmN* Δ *rlmM*)] koloonia 2xYT vedelsöötmesse, ruumalas 2ml. Üleöö kultuuridest valmistati lahjendused 100 ml samasse söötmesse ja inkubeeriti loksutis kuni OD₆₀₀ jäi vahemikku 0,8 - 1. Bakterirakud koguti Sorvall GSA rootoriga 4000 rpm 8 minutit, seejärel sõõde aspireeriti.

2.8.2 Rakulüsaadi valmistamine ja ribosoomide eraldamine

E. coli rakkude sade suspendeeriti 1 ml LP lüüsipuhvis, millele lisati ensüümid lüütsüüm (lõppkontsentratsioon 2mg/ml) ja Dnase I (lõppkontsentratsioon 20U/ml). Rakumembraanide lõhkumiseks inkubeeriti bakterirakke 20 minutit jääs ja kasutati külmutamise-sulatamise meetodit, kus rakud külmutati vedellämmastikuga ning hoiti 20 minutit temperatuuril -80 °C, seejärel rakud sulatati jää-vee segul. Mehaaniliseks lüüsimiseks kasutati 0,5 ml klaaskuule (diameetriga 0,1mm), millele lisati 1 ml eelnevalt lüüsitud rakke. Rakke lüüsi Persellys 24 homogenisaatoriga vastavalt tootjapoolsele juhendile. Lüüsiefektiivsuse tõstmiseks lisati

rakkudele detergente DOC (lõppkontsentratsioon 0,8%) ja Brij (lõppkontsentratsioon 0,5%) ja proove segati rotaatoril 20 minutit 4°C juures rpm 10. Peale rakkude lüüsi sadestati membraan-kromosomaalne kompleks lauafuugiga 13 000 rpm 10 minutit. Ribosoomide kvantifitseerimiseks mõõdeti suprenatandi optiline tihedus lainepikkusel 260 nm.

Ribosoomide ja subühikute eraldamiseks kasutati sahharoosi gradiendi meetodit. Sahharoosi kontsentratsioon muutus lineaarselt 15%-st kuni 40%-ni. Ribosoomi partiklite eraldamiseks kanti sahharoosi gradiendile 30U rakulüsaati (LLP puhvril) ja ultratsentrifuugiti $\omega^2 t = 2.8 \times 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, temperatuuril 4°C. Fraktsioonide visualiseerimiseks kasutati läbivoolu-spektrofotomeetrit (OD_{260}), peristaltilist pumpa ning isekirjutajat.

3 Tulemused ja arutelu

3.1 Escherichi coli tüvede MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE::Km$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) konstrueerimine

Erinevates töödes on näidatud 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide olulisust ribosoomi funktsionaalusele *in vitro*, kuid täpselt pole teada nende modifikatsioonide olulisus ribosoomi funktsionaalsusele *in vivo*. Märgitud on ka, et *in vivo* üksikute modifikatsioonide puudumine *E. coli* 23S rRNA domeenist V ei põhjusta üldjuhul bakterirakkudele märgatavaid fenotüübilisi erinevusi *wild type* tüvedest. Erandiks on uridiinmetülatsioon positsioonis 2552, mida katalüüsib metüültransferaas RlmE ja mis on ühtlasi ka kuumašoki valk (Conrad et al., 1998; Del Campo et al., 2001; Lövgren ja Wikström, 2001; Bügl et al., 2000; Purta et al., 2009; Toh et al., 2008). Green ja Noller püstitasid 1996. aastal hüpoteesi, mille kohaselt 23S rRNA domeeni V 80 nukleotiidses järjestuses (nt 2445-2523) paiknevad modifikatsioonid või modifikatsioonide kombinatsioon, mis on rakkudele eluliselt hädavajalik (Green ja Noller 1996). Käesolevas bakalaureuse töös püstitatud eesmärkide teostamiseks konstrueeriti *E. coli* tüved, kus erinevates kombinatsioonides deleteeriti modifikatsiooniensüümide geene, vastavalt *rluF*, *rlmE*, *rlmKL*, *rlmN*, *rlmM*.

Algse retsipienttüvena kasutati *E. coli* tüve MG1655 (*ArluC*), mille sai eksperimentaator PhD. Margus Leppikult. Kõik tüved konstrueeriti vastavalt kirjeldatud meetodikale (ptk 2.7). Tüvede konstrueerimisel kasutati transdutseerimiseks bakteriofaagi P1, mis on võimeline viiruspartiklisse võtma kuni 100 kb suuruse DNA fragmendi doonortüvest (Łobocka et al., 2004). P1 viiruspartiklite loomisel kasutati doonortüvedena Keio kollektiooni tüvesid, millest olid deleteeritud vastavalt *rluF*, *rlmE*, *rlmKL*, *rlmN* või *rlmM* geenid. Kõik Keio kollektiooni doonortüved (JW3982-1, JW3146-2, JW0931-1, JW2501-1 ja JW2777-1) sisaldavad deleteeritud geeni asemel kanamütsiini resistentsukasseti, mis paikneb pärmil Flp-rekombinaasi sihtmärk järjestuste (FRT) vahel (Baba et al., 2006). Bakteriofaagi P1 vahendatud transdutseeritav DNA integreerub retsipienttüve genoomi RecBCD ja RecA medieeritud homoloogilise rekombinatsiooni abil (Łobocka et al., 2004). Kui P1 partiklisse pakitud DNA ja retsipienttüve genoomi vahel toimub homoloogiline rekombinatsioon, siis on võimalik konstrueerida *E. coli* tüvesid, kuhu saab sisestada eksperimentaatori soovitud DNA fragmente. Kanamütsiini resistentsuskassetiga on võimalik transdutseeritud kolooniad selekteerida transdutseerimata kolooniatest.

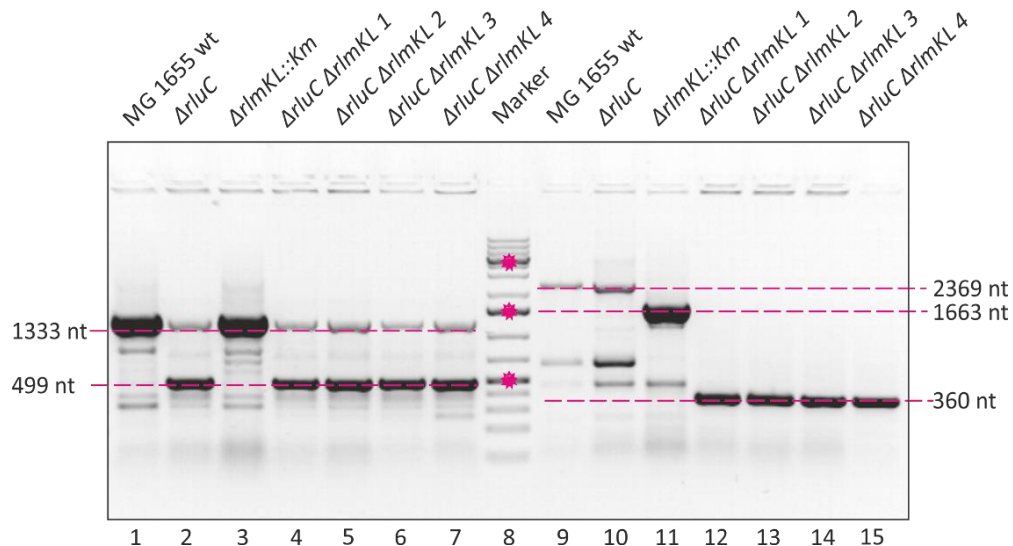
Escherichia coli $\Delta rluC \Delta rlmKL$ tüve konstrueerimiseks kasutati transdutseerimisel doonortüvena JW0931-1 ($\Delta rlmKL::Km$) ning retsipienttüvena MG1655 ($\Delta rluC$).

Transduktsiooni tulemusena valmistati konstrukt, milles puudusid nii *rluC* kui *rlmKL* geenid, kuid mis sisaldas kanamütsiini resistentsuskasseti. Valmistatud konstrukti valideerimiseks teostati koloonia-PCR vastavalt eelpool toodud metoodikale (ptk 2.8). PCR produktide visualiseerimiseks valmistati 1% agarosgeel TBE puhvris. Elektroforees viidi läbi 45 minuti jooksul 110V.

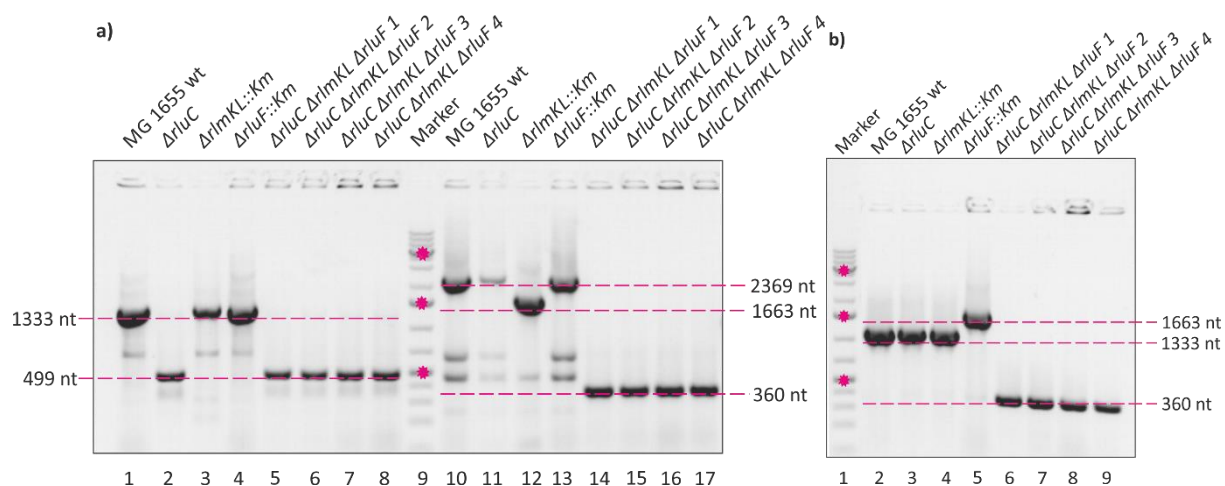
Järgmise etapina sooviti konstrueeritud tüvest (MG1655 $\Delta rluC \Delta rlmKL::Km$) eemaldada kanamütsiini resistentsuskasset, et oleks võimalik jätkata teiste modifikatsiooniensüümide geenide eemaldamisega tüvest. Selleks teostati konstrueeritud tüvega transformatsioon, mille käigus muudeti rakud keemilise töötusega kompetentseteks. Keemiliselt kompetentsete rakkude loomisel on olulised $CaCl_2$, mis muudab rakumembraanid geneetilisele materjalile läbitavaks, ning $RbCl$, mis soodustab negatiivse laenguga DNA fragmentide kinnitumist rakumembraanile. *Heat shocki* abil siseneb DNA lõplikult rakku. Antud bakalaureusetöö katsetes kasutati *E. coli* erinevate tüvede transformeerimiseks plasmidi pCP20. pCP20 sisaldab ampitsilliini ja klooramfenikooli resistentsuse geeni, FLP-rekombinaasi geeni ning temperatuuritundlikku replikoni (Datsenko ja Wanner, 2000). Kuna Keio kollektsiooni tüvest (JW0931-1) transdutseeritud DNA fragmendi kanamütsiinikasseti kummaski otsas on FRT (*Flp recombination target*) järjestused ning pCP20 pealt kodeeritakse FLP rekombinaas, siis on võimalik teostada FLP-FRT vahendatud rekombinatsioon. Seega transformatsiooni käigus on võimalik konstrueeritud tüvest MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL$) eemaldada kanamütsiini resistentsuskasset. Transformeerunud rakkude selektsiooni tagamiseks kasutati ampitsilliini sisaldavat LB söödet. Plasmidi eemaldamiseks rakkudest inkubeeriti valitud kolooniaid 37 °C juures üleöö LB, LB+Km ja LB+Amp tardsöötmetel. Kuna pCP20 sisaldab temperatuuritundlikku replikoni, siis temperatuuri tõustes represseerub plasmidi pCP20 replikatsioon ja rakkude jagunemise käigus plasmid tütarakkudele edasi ei kandu, seega kanamütsiini ja ampitsilliini sisaldaval söötmel kolooniaid moodustuda ei saa (Cherepanov ja Wackernagel, 1995). Kolooniatest, mis moodustusid 30 °C juures LB söötmel valiti mõned, mis plaaditi uuele LB tardsöötmele ning inkubeeriti 37 °C juures. Üleöö moodustunud uutest kolooniatest tehti valik, mida kontrolliti koloonia-PCR meetodiga. Kui tüves puudusid nii *rluC* ja *rlmKL* geenid kui kanamütsiini resistentsuskasset oli tüve konstrueerimine õnnestunud.

Kõik järgnevad tüved : MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE$) valmistati eelnevalt

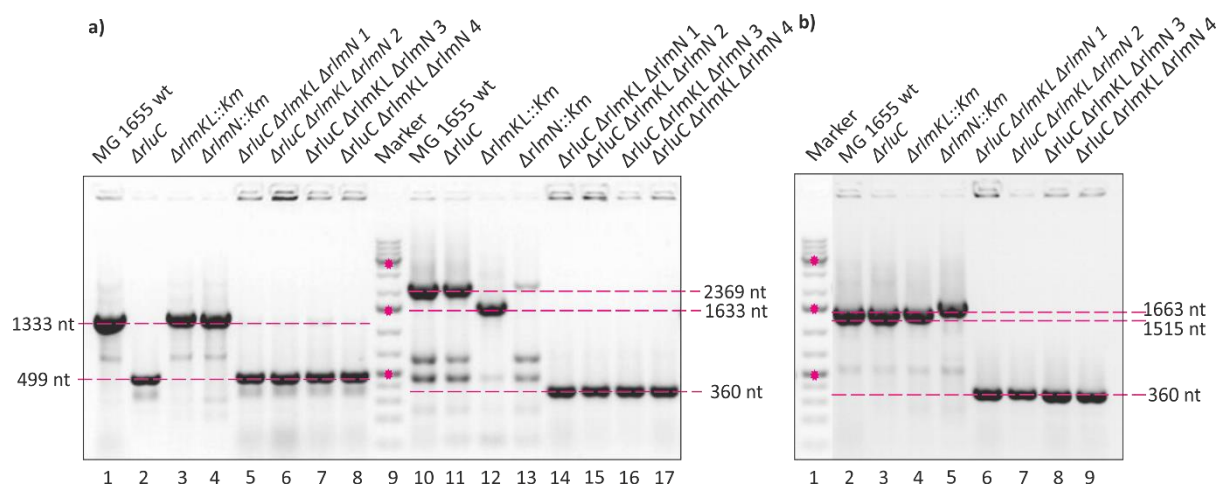
kirjeldatud põhimõtetel. Kõigi konstrueeritud tüvede valideerimisel PCRga (joonis 7-11) kasutati deleteerunud geenide kontrollimiseks vastavalt tüve spetsiifikale praimereid, mille geenid olid deleteeritud. PCR-produktidena saadud fragmenide suurused ja praimerite kaugused geeni ottest on toodud Lisas 1.



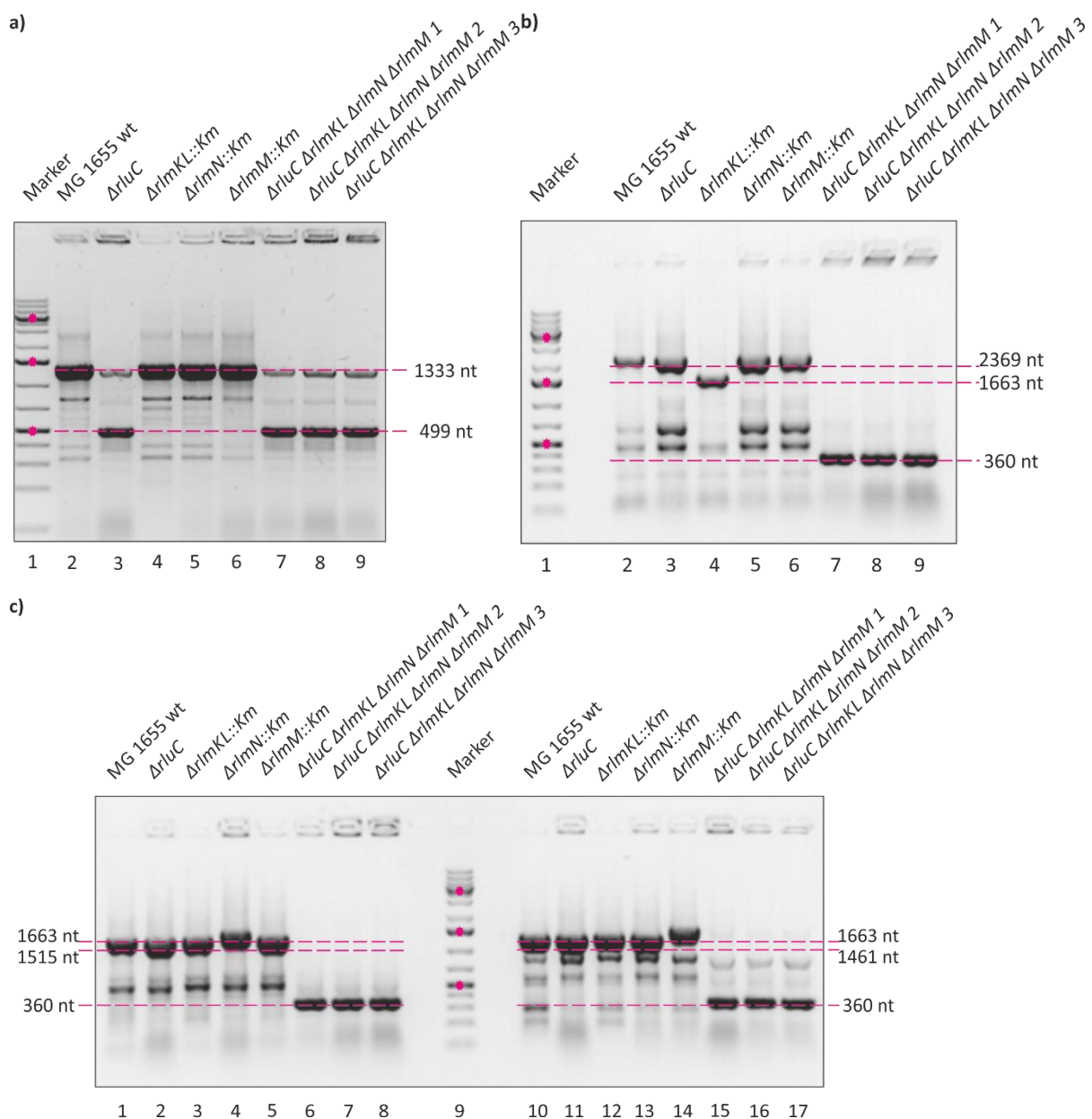
Joonis 7. *ΔrluC ΔrlmKL* tüve valideerimine. Tüve konstrueerimine on õnnestunud, kui deleteerunud on nii *rluC* kui *rlmKL* geenid. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutati markerit (Gene Ruler 1kb DNA Ladder), mille rajal (rada 8) on ülevalt alla märgitud fuksiaroosa tärniga DNA fragmendid pikkustega 5000 nt, 1500 nt ja 500 nt. Radadel 1-7 on kasutatud *rluC* praimereid, radadel 9-17 *rlmKL* praimereid. Kontrolltüvedena on kasutatud MG1655 wt, *ΔrluC* ja *ΔrlmKL* tüvede kolooniaid. MG1655 wt koloonia (radadel 1 ja 9) sisaldab nii *rluC* kui *rlmKL* geene (vastavalt 1333 nt ja 2369 nt fragmendid). *ΔrluC* tüve koloonia rakkudes (radad 2 ja 10) on deleteerunud *rluC* geen (499 nt fragment), kuid alles on *rlmKL* geen (2369 nt fragment). *ΔrlmKL* tüve koloonia DNA fragmendid (radad 3 ja 11) näitavad *rluC* geeni olemasolu (1333 nt fragment) ja *rlmKL* geen on asendunud Km-resistentsuskassetiga (1663 nt fragment) (Baba et al., 2006). Konstrueeritud tüve *ΔrluC ΔrlmKL* kolooniate 1-4 (radad 4-7 ja 12-15) PCR produktid näitavad, et tüvest on deleteerunud nii *rluC* kui *rlmKL* geenid (vastavalt 499 nt ja 360 nt fragmendid).



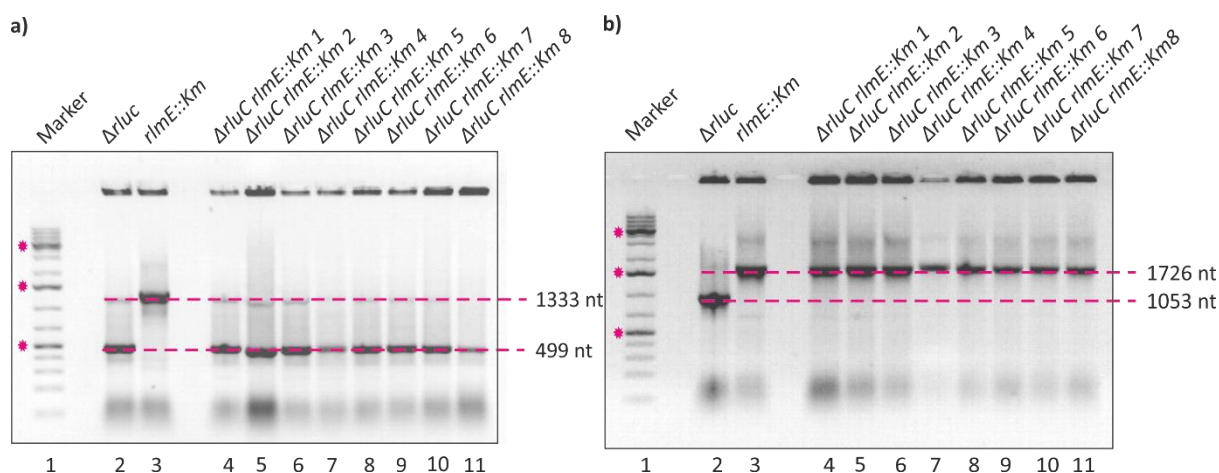
Joonis 8. *ArhuC ArlmKL ArluF* tüve valideerimine. Tüve konstrueerimine on õnnestunud, kui lisaks *rluC* kui *rlmKL* geenidele on deleteerunud ka *rluF* geen. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutati markerit (Gene Ruler 1kb DNA Ladder), mille radadel **a)** rada 8 ja **b)** rada 1 on ülevalt alla märgitud fuksiaroosa tärniga DNA fragmendid pikkustega 5000 nt, 1500 nt ja 500 nt. **a)** Geelelektroforeesi pilt on analoogne joonisele 7. Rajal 9 on marker DNA fragmentide pikkuse määramiseks. Radadel 2-8 on kasutatud *rluC* praimereid ning radadel 10-17 *rlmKL* praimereid. Kontrolltüvedele on lisandunud *ArluF::Km* tüve koloonia (rajad 4 ja 13). Konstrueeritud tüve kolooniates (rajad 5-8 ja 14-17) on endiselt puudu *rluC* ja *rlmKL* geenid (vastavalt 499 nt ja 360 nt). **b)** Radadel 2-9 kasutati PCRi läbiviimiseks *rluF* praimereid. Kontrolltüvedena kasutatud MG1655 wt, *ArhuC* ja *ArlmKL* tüved sisaldavad *rluF* geeni (1333 nt). *ArluF::Km* tüves (rada 5) on *rluF* geen asendatud Km-resistentsuskassetiga (1663 nt) (Baba et al., 2006). Konstrueeritud tüve kolooniad (rajad 6-9) ei sisalda *rluF* geeni (360 nt).



Joonis 9. *ArhuC ArlmKL ArlmN* tüve valideerimine. Tüve konstrueerimine on õnnestunud kui lisaks *rluC* ja *rlmKL* geenidele on deleteerunud *rlmN* geen. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutati markerit (Gene Ruler 1kb DNA Ladder), mille radadel **a)** rada 9 ja **b)** rada 1 on ülevalt alla märgitud fuksiaroosa tärniga DNA fragmendid pikkustega 2000 nt, 1500 nt ja 500 nt. **a)** Radadel 1-8 on kasutatud *rluC* praimereid ja radadel 10-17 *rlmKL* praimereid. Kontrolltüvedena on kasutatud MG1655 wt (rajad 1 ja 10), *ArhuC*, *ArlmKL::Km* ja *ArlmN::Km* tüvesid. Radadel 5-8 ja 14-17 on kasutatud kolooniaid *ArhuC ArlmKL ArlmN* tüvest. Radadel 1, 3 ja 4 on näha, et vastavad tüved sisaldavad *rluC* geeni (1333 nt) ning radadel 3, 5-8 kasutatud kolooniates on *rluC* geen deleteerunud (499 nt). Radadel 10, 11 ja 13 on näha, et vastavad tüved sisaldavad *rlmKL* geeni (2369 nt), kuid radadel 12, 13, 15-17 kasutatud kolooniad mitte (360 nt). Rajal 12 kasutatud koloonia (*ArlmKL::Km*) sisaldab *rlmKL* geeni asemel Km-resistentsuskasseti. **b)** Radadel 2-9 on kasutatud *rlmN* praimereid. Rajal üks on näidatud marker, kontrolltüved on paigutatud radadele 2-5 vastavalt MG1655 wt, *ArhuC*, *ArlmKL::Km* ja *ArlmN::Km*. Radadel 6-9 on kasutatud kolooniaid *ArhuC ArlmKL ArlmN* tüvest. Radadel 2-4 paiknevad kontrolltüvede kolooniad sisaldavad *rlmN* geeni (1515 nt), rajal 5 paiknev koloonia sisaldab *rlmN* geeni asemel Km-resistentsuskasseti (1663 nt) ning konstrueeritud tüve kolooniad radadel 6-9 ei sisalda *rlmN* geeni (360 nt).



Joonis 10. *ArluC ArlmKL ArlmN ArlmM* tüve valideerimine. *E. coli* tüve konstrueerimine on õnnestunud kui tüves puuduvad geenid *rluC*, *rlmKL*, *rlmN* ja *rlmM*. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutati markerit (Gene Ruler 1kb DNA Ladder), mille radadel **a)** rada 1, **b)** rada 1 ja **c)** rada 9 on ülevalt alla märgitud fuksiaroosa tärniga DNA fragmendid pikkustega 2000 nt, 1500 nt ja 500 nt. Geelelektroforeesi pilt on analoogne joonisele 10, kuid kontrolltüvena on lisandunud *ArlmM::Km* tüvi. **a)** Geelelektroforeesi läbiviimiseks kasutati *rluC* praimereid. Radadel 2, 4-6 paiknevad tüved sisaldavad *rluC* geeni (1333 nt), radadel 3, 7-9 kasutatud tüvede kolooniasest on *rluC* geen deleteerunud (499 nt). **b)** Radadel 2, 3, 5, 6 kasutatud tüvede kolooniad sisaldavad *rlmKL* geeni (2369 nt), rajal 4 asuvas tüves on *rlmKL* geen asendunud Km-resistentsuskassetiga (1663 nt), radadel 7-9 asuva tüve kolooniatest on *rlmKL* geen deleteerunud (360 nt). **c)** Radadel 1-8 on kasutatud *rlmN* praimereid ja radadel 10-17 *rlmM* praimereid. Radadel 1-3, 5 asuvate kontrolltüvede kolooniad sisaldavad *rlmN* geeni (1515 nt), rajal 4 asuva tüve *rlmN* geen on asendunud Km-resistentsuskassetiga (1663 nt), radadel 6-9 kasutatud tüve kolooniatest on *rlmN* geen deleteerunud (360 nt). Radadel 10-13 kasutatud kontrolltüved sisaldavad *rlmM* geeni (1461 nt), rajal 14 asuv kontrolltüvi sisaldab *rlmM* geeni asemel Km-resistentsuskasseti (1663 nt) ning radadel 15-17 asuva tüve kolooniatest on *rlmM* geen deleteerunud (360 nt).



Joonis 11. *ArluC* *ΔrlmE::Km* tüve valideerimine. Tüve konstrueerimine on õnnestunud, kui deleteerunud on nii *rluC* geen kui *rlmE* geen. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutati markerit (Gene Ruler 1kb DNA Ladder), mille radadel **a)** rada 1 ja **b)** rada 1 on ülevalt alla märgitud fuksiarioosa tärniga DNA fragmentid pikkustega 2000 nt, 1500 nt ja 500 nt. **a)** Radadel 2-9 on PCR läbiviimiseks kasutatud *rluC* praimereid. Kontrolltüvedena on kasutatud *ΔrluC* ja *ΔrlmE::Km* tüvesid vastavalt radadel 2 ja 3. Radadel 4-11 on kontrollitud tüves *ΔrluC* *ΔrlmE::Km* *rluC* geeni olemasolu. Rajal 2 asuv koloonia ei sisalda *rluC* geeni (499 nt) ja rajal 3 paiknev koloonia sisaldab (1333 nt). Konstrueeritud tüve kolooniatest radadel 4-11 on *rluC* geen deleteerunud (499 nt). **b)** Radadel 2-9 on PCR läbiviimiseks kasutatud *rlmE* praimereid. Kontrolltüvede kolooniad asuvad radadel 2 ja 3. Konstrueeritud tüve kolooniad asuvad radadel 4-11. Rajal 2 asuv tüvi sisaldab *rlmE* geeni (1053 nt), rajal 3 asuva tüve *rlmE* geen on asendatud kanamütsiini resistentsuskassetiga (1726 nt). Konstrueeritud tüve kolooniates (rajad 4-11) on samuti *rlmE* geen asendunud Km-resistentsuskassetiga (1726 nt).

3.1.2 Konstrueeritud *E. coli* tüved

Tüve nimi	Genotüüp
MG1655 (<i>ΔrluC</i> <i>ΔrlmE::Km</i>)	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1 <i>ΔrluC</i> 753 <i>ΔrrmJ</i> 786:: <i>kan</i>
MG1655 (<i>ΔrluC</i> <i>ΔrlmKL</i>)	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1 <i>ΔrluC</i> 753 <i>ΔrlmL</i> 764
MG1655 (<i>ΔrluC</i> <i>ΔrlmKL</i> <i>ΔrlmN</i>)	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1 <i>ΔrluC</i> 753 <i>ΔrlmL</i> 764 <i>ΔyfgB</i> 763
MG1655 (<i>ΔrluC</i> <i>ΔrlmKL</i> <i>ΔrluF</i>)	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1 <i>ΔrluC</i> 753 <i>ΔrlmL</i> 764 <i>ΔrluF</i> 789
MG1655 (<i>ΔrluC</i> <i>ΔrlmKL</i> <i>ΔrlmN</i> <i>ΔrlmM</i>)	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1 <i>ΔrluC</i> 753 <i>ΔrlmL</i> 764 <i>ΔyfgB</i> 763 <i>ΔygdE</i> 733

Lisaks proovis eksperimentaator transformatsiooniga eemaldada kanamütsiini resistentsuskasseti tüvest, kus puuduvad nii *rluC* kui *rlmE* geenid (*ΔrluC* *ΔrlmE::Km*), kuid ka nelja korduskatse järel see ei õnnestunud. Kuna Km-resistentsuskasset oli transdutseeritud Keio kollektsiooni tüvesse (JW3146-2), siis tulemuste kontrollimiseks peab töö autor looma ka tüve, milles puuduksid mõlemad *rluC* ja *rlmE* geenid, kuid selektiivsust tagav Km-resistentsuskasset oleks transdutseeritud MG1655 tüvesse. Katse ebaõnnestumine võib olla

seotud puuduva kuumašoki valguga, kuna transformatsiooniks vajaliku plasmidi (pCP20) sisenemine rakku toimub kuumašoki abil. Samas temperatuuritundlikkuse määramise katsetest selgub, et *rluC* ja *rlmE* geenide deletsioon ei põhjusta selle tüve kolooniatel kasvudefekti 42 °C juures võrreldes referentsüvega (MG1655 wt). Teine tõenäolisem hüpotees selle katse ebaõnnestumiseks võib olla mutatsioon Flp-rekombinaasi sihtmärk järjestuses (FRT). Mutatsiooni korral pole Flp-rekombinaas võimeline kanamütsiini resistentsuskasseti plasmidi (pCP20) vastu vahetama.

Samuti proovis eksperimentaator paralleelselt luua tüvesid, kus korraga puuduksid nii *rluC*, *rlmKL*, *rlmN* ja *rluF* geenid. Selleks kasutati transduktsiooni doonortüvedena Keio kollektsiooni tüvesid, millest oli deleteeritud *rluF* geen või *rlmN* geen. Retsipienttüvedena kasutati vastavalt tüvesid, milles oli deleteeritud *rluC*, *rlmKL* ja *rlmN* geenid või *rluC*, *rlmKL* ja *rluF* geenid. Pärast nelja korduskatset selliste tüvede konstrueerimine ei õnnestunud, mis võib märku anda bakalaureusetöös püstitatud hüpoteesi ümberlükkamisest: ei ole võimalik konstrueerida *Escherichia coli* tüve, milles puuduksid kõik 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid. Nende nelja ensüümi (RluC, RlmKL, RlmN, RluF) poolt modifitseeritavad nukleotiidid paiknevad positsioonides G2069, G2445, A2503, U2504, U2580, U2604 (joonis 4). Üksikute puuduvate modifikatsioonidega tüvedel võivad fenotüübilised efektid väga väikesed olla, kuid suuremas hulgas modifikatsioonide puudumise tõttu võivad efektid kumuleerida ning letaalseks muutuda. Et kindel olla, kas tüve konstrueerimine ebaõnnestus just RluF ja RlmN ensüümidega seotud modifikatsioonide puudumise tõttu, peaks töö autor tulevikus konstrueerima tüve, kus puuduvad ainult nende kahe ensüümi poolt katalüüsitavad modifikatsioonid (vastavalt Ψ2604 ja m²A2503).

3.2 *Escherichia coli* konstrueeritud bakteritüvede MG1655 (Δ rluC Δ rlmE), MG1655 (Δ rluC Δ rlmKL), MG1655 (Δ rluC Δ rlmKL Δ rlmN), MG1655 (Δ rluC Δ rlmKL Δ rluF) ja MG1655 (Δ rluC Δ rlmKL Δ rlmN Δ rlmM) analüüsimine

3.2.1 Temperatuuritundlikkuse analüüsimine

Kõigi bakalaureusetöö käigus konstrueeritud tüvede fenotüübi analüüsimiseks tehti katseid määramaks modifikatsioonide puudumise mõju temperatuuritundlikkusele. Selleks inokuleeriti LB tardsöötmetelt igast konstrueeritud tüvest üks koloonia 2xYT vedelsöötmesse ja kasvatati üleöö loksutis. Vedelsöötmetest tehti joonkülvade erinevate mutanttüvedega samas konfiguratsioonis viis paralleeli (joonis 12 ja joonis 13). Kõiki tüvesid inkubeeriti temperatuuridel 16 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C ja 42 °C. Referentstüveks võeti MG1655 wt tüvi.

16 °C



25 °C



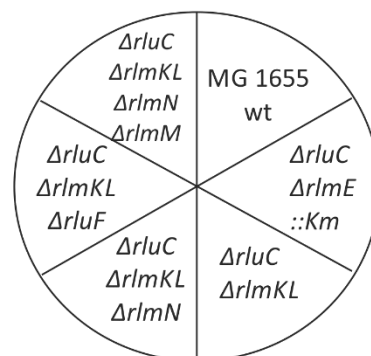
30 °C



37 °C



42 °C



Joonis 12. Deletsioonitüvede kasvufenotüübi analüüs. Erinevatel temperatuuridel inkubeeritud joonkülvid tüvedest MG1655 wt, MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$).

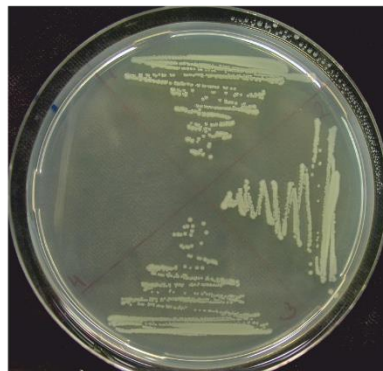
Joonisel 12 on näha, et eksperimentaatori poolt konstrueeritud tüvede MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) ning MG1655 referentstüve fenotüüpides erinevatel temperatuuridel (16 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C ja 42 °C) märgatavaid erinevusi ei esine. Kuna ka üksikute modifikatsioonide puudumine 23S rRNA domeenist V rakkude fenotüüpi silmnähtavalt ei mõjuta, siis võib tulemustest järeldada, et sellises kombinatsioonis

modifikatsioonide puudumine ei põhjusta *E. coli* rakkudes drastilisi muutuseid. Selleks, et uurida, kas $\Delta rluC \Delta rlmE::Km$ tüve kasv erinevatel temperatuuridel, on seotud ühega deleteeritud geenidest või on fenotüüp tekkinud kahe mutatsiooni mõjul tehti lisakatse (joonis 13), kuhu külvati referentstüvele MG1655 lisaks ka MG1655 ($\Delta rluC$) ja JW3146-2 ($\Delta rlmE::Km$) tüved.

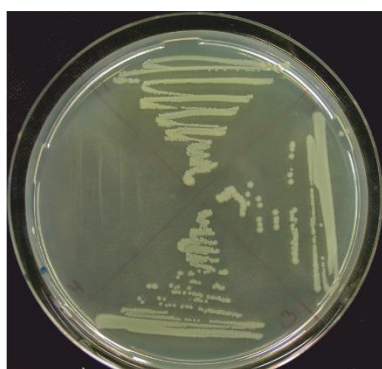
16 °C



25 °C



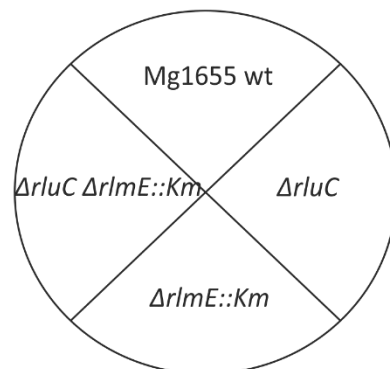
30 °C



37 °C



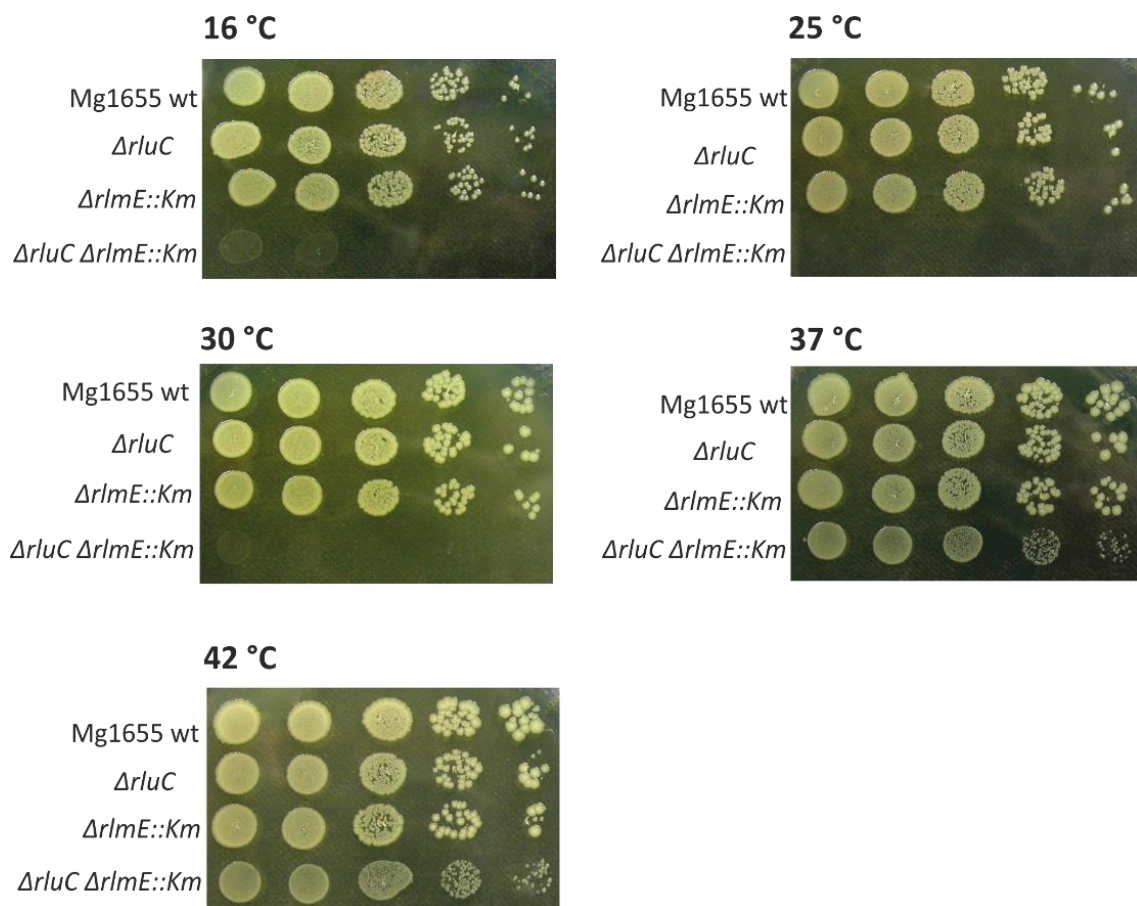
42 °C



Joonis 13. Deletsioonitüvede kasvufenotüübi analüüs. Erinevatel temperatuuridel inkubeeritud joonkülvid tüvedest MG1655 wt, MG1655 ($\Delta rluC$) ja JW3146-2.

Kõige suurem muutus fenotüübis esineb *E. coli* tüvel, kus puuduvad nii *rluC* kui *rlmE* geenid (joonis 13). Kui võrrelda $\Delta rluC \Delta rlmE::Km$ tüve nii MG1655 wt tüve, $\Delta rluC$ tüve ning $\Delta rlmE$ tüvega (joonis 13), siis on näha, et kolooniate moodustumine aeglustub oluliselt inkubatsioonitemperatuuri alanemisega. Selle tüve kasv temperatuuridel 16 °C, 25 °C ja 30 °C on märgatavalt aeglasem valitud referentsüvedest. Samuti on rakkude kasv aeglustunud kõrgematel temperatuuridel. Huvitav on ka konstrueeritud tüvede võrdlus temperatuuridel 37 °C ja 42 °C. Kuna rakkude optimaalseks kasvutemperatuuriks peetakse 37 °C, siis võiks eeldada, et optimaalsel temperatuuril kasvanud rakud moodustavad jõulisemad kolooniad. Joonisel 13 olevast kasvufenotüübi võrdlusest on aga märgata, et 42 °C juures on joonkülv tugevam kui 37 °C juures. Conrad et al. on näidanud, et RluC poolt katalüüsitavate pseudouridiinide puudumine positsioonides U2504 ja U2580 ei põhjusta rakkude fenotüübis olulisi erinevusi võrreldes referentstüvega (Conrad et al., 1998). Kuid RlmE poolt sünteesitava metülatsiooni puudumine positsioonis U2552 põhjustab bakteritüvel aeglasemat kasvukiirust (Bügl et al., 2000). Tulemus on eriti huvitav just selle pärast, et RlmE ehk teisisõnu FtsJ/RrmJ valk on lisaks metüültransferaasele aktiivsusele ka kuumašoki valk (Caldas et al., 2000). Sellest oleks võinud eeldada, et fenotüübiline efekt suureneb kõrgematel temperatuuridel, mida aga ei juhtunud.

Konstrueeritud tüve $\Delta rluC \Delta rlmE::Km$ veelgi selgemaks temperatuuritundlikkuse võrdluseks tehti *spot*-testid tüvedega MG1655 wt, MG1655 ($\Delta rluC$), JW3146-2 ($\Delta rlmE::Km$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE::Km$) temperatuuridel 16 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C ja 42 °C (joonis 14). Nagu ka eelnev temperatuuritundlikkuse analüüs joonkülvidega (joonis 13) kinnitavad tehtud *spot*-testid, et konstrueeritud mutanttüve rakud on tundlikumad madalamatele temperatuuridele (16 °C, 25 °C, 30 °C) ja kasvavad väga aeglaselt. Ka võrdlus 37 °C ja 42 °C juures kasvatatud paralleelidega kinnitab mutanttüve paremat võimet moodustada kolooniaid kõrgmal temperatuuril.



Joonis 14. Spot-testid tüvedega MG1655 wt, MG1655 ($\Delta rluC$), JW3146-2 ($\Delta rlmE::Km$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE::Km$) temperatuuridel 16 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C ja 42 °C. LB-tardsöötmele pipeteeriti 5 μ l kultuuri. Kultuuride lahjenemise suund on vasakult paremale.

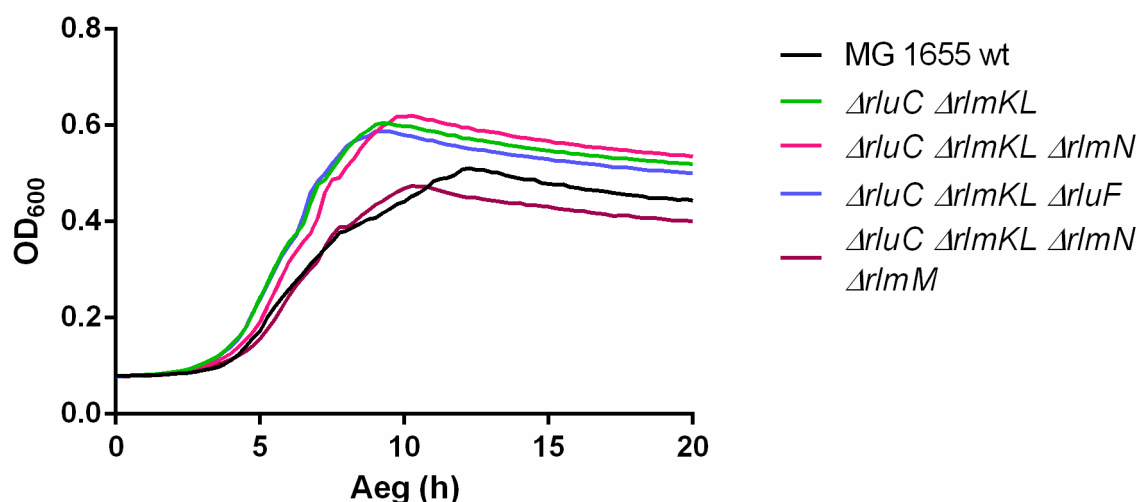
3.2.2 Konstrueeritud bakteritüvede kasvukiiruse analüüsimine

Eelnevas peatükis esitatud temperatuuritundlikkuse katsete tulemused ei selgita erinevate mutanttüvede kasvukiiruseid eri faasides. Tuvastamaks 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide puudumise mõju rakkude eri kasvufaasidele, mõõdeti konstrueeritud tüvede kasvukiiruseid. Konstrueeritud *E. coli* tüvede kasvukiiruste määramiseks ja võrdlemiseks inokuleeriti LB tardsöötmetelt kahes korduses üks *E. coli* tüvi (MG1655 wt, MG1655 ($\Delta rluC$), JW3146-2 ($\Delta rlmE::Km$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$)) 1 ml MOPS minimaalsöötmesse ning inkubeeriti loksutis üleöö 37 °C. Seejärel tehti vedelkultuuridest 200x lahjendused ning pipeteeriti kahes korduses 100 μ l rakukultuuri mikroplaadi kaevukestesse. Rakke inkubeeriti 37 °C juures 20h ja optilist tihedust mõõdeti 15 minutiliste vahedega lainepikkusel 600nm. MOPS minimaalsööde sisaldab rakkude kasvuks füsioloogiliselt optimaalseid tingimusi, süsiniku allikana kasutatakse glükoosi. Seega antud minimaalsöötmes on hea uurida *E. coli* tüvede kasvu

looduslikele tingimustele lähedasemas meediumis kui näiteks rikkas LB vedelsöötmes. (Neidhardt et al., 1974).

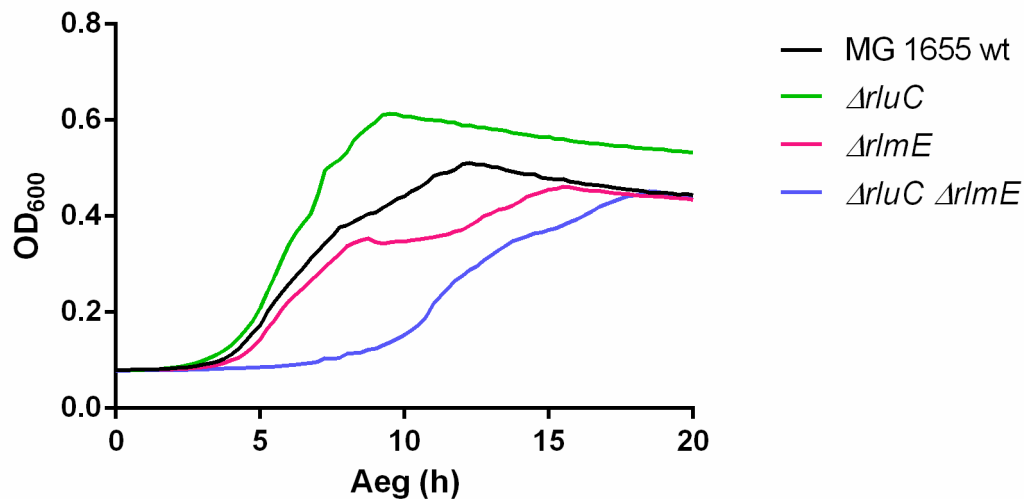
Joonisel 15 on näha, et kõigi tüvede (MG1655 wt, $\Delta rluC \Delta rlmKL$, $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$, $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$ ja $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) oote- ehk lag-faasid on sarnase pikkusega. Erinevused esinevad aga eksponentsiaalses faasis. $\Delta rluC \Delta rlmKL$, $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$, $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$ tüvede eksponentsiaalse faasi kasv on kiirem kui MG1655 wt ja $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$ tüvedel. Samas MG1655 wt ja $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$ eksponentsiaalse faasi kasvu kiirused on sarnased. Tulemus on mõnevõrra üllatav ja vastupidine töö hüpoteesile, kuid võib järeldada, et modifikatsioonide puudumine positsioonides $\Psi 2504$, $\Psi 2580$, m^2G2445 , m^72069 , m^2A253 või $\Psi 2604$ kasvatemperatuuril 37°C ei põhjusta näivaid muutusi rakkude kasvu puhul. Seega võib mõnedel modifikatsioonidel olla ribosoomi funktsionaalsuse kohast teine funktsioon, kui valgusüntees. Toh et al. on näidanud, et m^2A253 hüpermetülatsioon muudab rakud resistentseks mitmete 23S rRNAle seonduvate antibiootikumide suhtes. Lisaks muudab modifikatsiooni puudumine selles piirkonnas rakud vastuvõtlikemaks tiamuliini, hügromütsiini A, sparsomütsiini ja linesoliidi vastu (Toh et al., 2008). Samuti on märgitud, et $\Psi 2504$ puudumisel suureneb rakkude tundlikkus klindamütsiinile, linesoliidile ja tiamuliinile (Toh ja Mankin, 2008). Seega võib mõnede modifikatsioonide olulisus peituda rakkudele resistentsuse tagamisel erinevate antibiootikumide suhtes. Tänapäeval aktuaalseks muutunud probleem on antibiootikumidele resistentsete super-bakterite levik ning kiire evolutsioneerumine (Jean ja Hsueh, 2011). Uurides modifikatsioonide mõju antibiootikumide resistentsusele oleks võimalik disainida uusi sünteetilisi antibiootikume, mis pääsevad mööda evolutsiooniliselt arenenud kaitsemehanismist.

Purta et al. on avaldanud töö, mille kohaselt *rlmM* geeni deletsioonist tulenev modifikatsiooni puudumine positsioonis C2498 põhjustab rakkude väiksemat fitnessi võrreldes referentstüvega (Purta et al., 2009). Joonisel 15 on näha, et rakud, millest on deleteeritud *rlmM* geen, on eksponentsiaalfaasis aeglasema kasvuga kui teised konstrueeritud tüved. Võrrelduna referentstüvega (MG1655 wt) ei ole aga võimalik erinevusi tuvastada.



Joonis 15. Kasvukõverate võrdlus. Võrreldud on tüvede MG1655 wt, $\Delta rluC \Delta rlmKL$, $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN$, $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$ ja $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$ kasvukiiruseid 20 h jooksul 100 μ l MOPS minimaalsöötmes.

Joonisel 16 on võrreldud tüvede MG1655 wt, MG1655 ($\Delta rluC$), JW3146-2 ($\Delta rlmE::Km$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE::Km$) kasvukiiruseid. Mõnevõrra üllatav on *rluC* deletsiooniga tüve eksponentsiaalfaasi kasvu kiirus võrrelduna MG1655 wt tüvega. *rlmE* deletsiooniga tüve lag-faas ehk ooteperiood on veidi pikem kui MG1655 referentstüvel. Bakalaureuse töös konstrueeritud tüve (MG1655 $\Delta rluC \Delta rlmE::Km$) lag-faas on oluliselt pikem referentstüvede lag-faasidest, samuti on ka eksponentsiaalse faasi graafiku tõusunurk väiksem, mis viitab probleemidele valgusünteesis. RlmE poolt sünteesitav metülatsioon positsioonis Um2552 asub A-lingus, mis seondub aminoatsüül-tRNAGA. Um2552 kõrval paiknev nukleotiid G2553 seondub otseselt aminoatsüül-tRNA nukleotiidiga C75. Mutatsioonid Um2552 ei põhjusta tugevat kasvufekti ning see tuleb välja ka käesolevast bakalaureuse tööst (Kim ja Green, 1999). Küll aga tekivad rakkudes tugevad kasvufektid kui puuduvad modifikatsioonid Um2552, Ψ 2504, Ψ 2580 domeenis V ning lisaks RluC poolt sünteesitav modifikatsioon Ψ 955 domeenis II. Seega võib leida kindel kombinatsioon modifikatsioonide, mis on rakkudele eluliselt olulised.



Joonis 16. Kasvukõverate võrdlus. Võrreldud on tüvede MG1655 wt, MG1655 ($\Delta rluC$), JW3146-2 ($\Delta rlmE::Km$) ja MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE::Km$) kasvukiiruseid 20 h jooksul 100 μ l MOPS minimaalsöötmes.

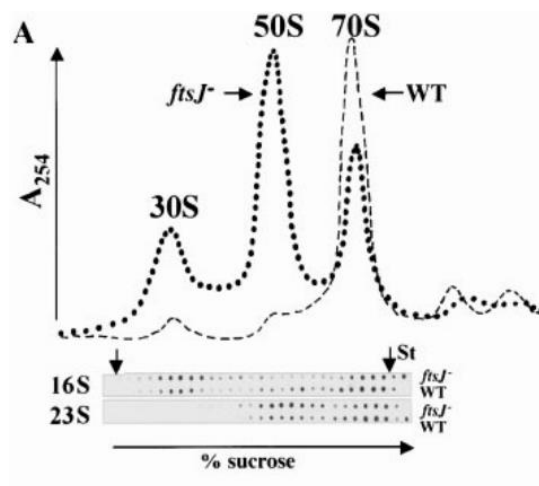
3.2.3 Konstrueeritud bakteritüvede MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) ribosoomide analüüs

Valitud tüvede (MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmE::Km$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$), MG1655 ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$)) ribosoomide ja subühikute analüüsimiseks fraktsioneeriti ribosoomid 15% - 40% sahharoosigradiendil ning visualiseeriti vastavalt metoodikas kirjeldatud meetoditele (ptk 2.9). Referentstüvedena kasutati tüvesid MG1655 wt, MG1655 ($\Delta rluC$) ja JW3146-2 ($\Delta rlmE::Km$).

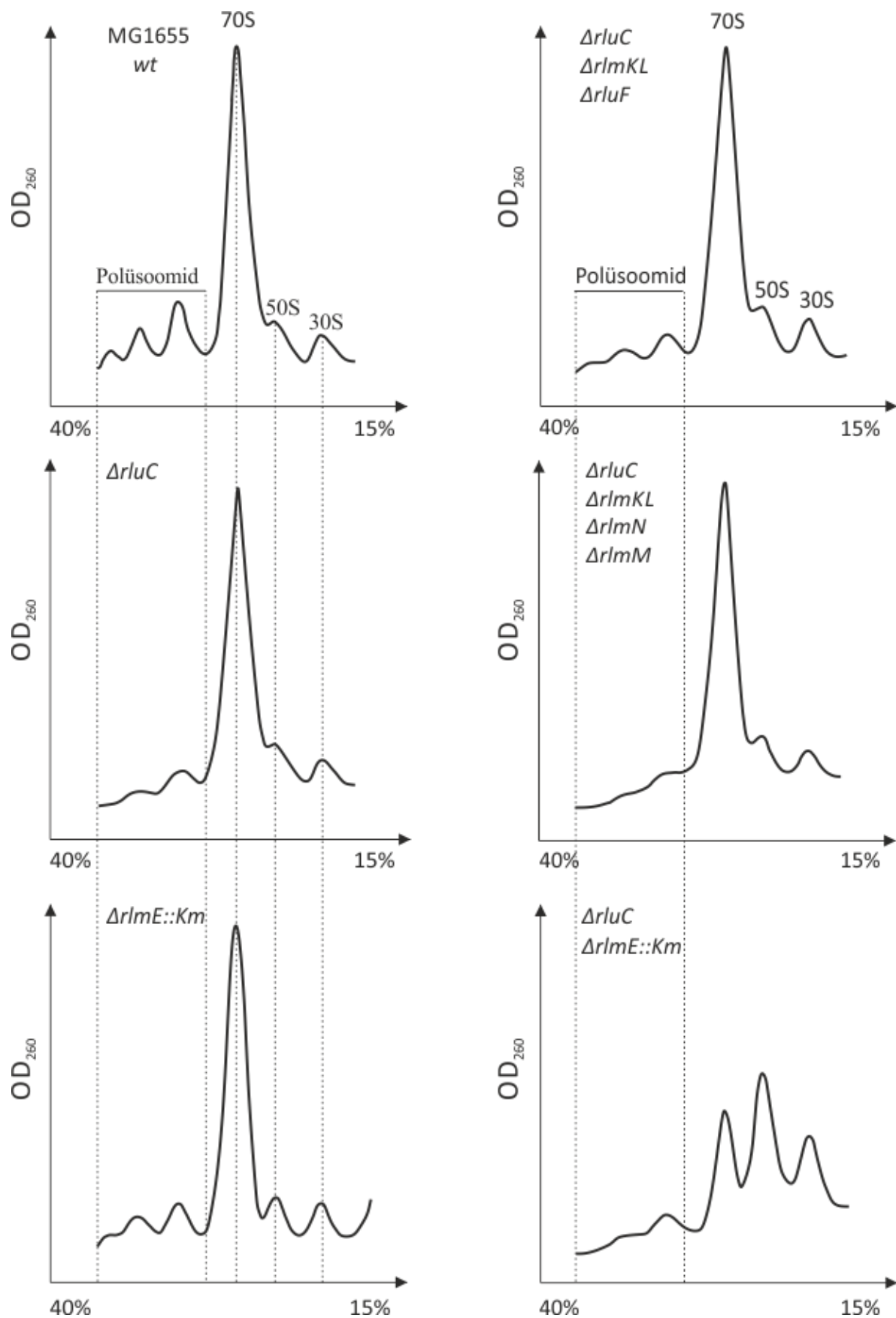
Joonisel 18 on näha, et konstrueeritud tüvedest ($\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rluF$ ja $\Delta rluC \Delta rlmKL \Delta rlmN \Delta rlmM$) 70S, 50S ja 30S partiklite osakaal sarnaneb MG1655 referentstüvele. Samas on kõigil konstrueeritud tüvedel vähenenud polüsoomide osakaal võrreldes wt tüvega, mis viitab, et mRNA transleerimisel võib ribosoomidel kerge probleem olla.

$\Delta rluC \Delta rlmE$ mutandil (joonis 18) on selgelt eristuv sahharoosi gradiendi profiil: 70S partiklite osakaal on oluliselt vähenenud 50S ja 30S partiklite osakaalud aga kasvanud. Lisaks on muutunud ka polüsoomide pilt. Võrreldes metsiktüüpi tüvega on ti- ja trisoomide silmnähtavalt vähem. Põhjenduseks võib pidada suurt vabade subühikute osakaalu ja funktsionaalsete 70S ribosoomide vähest hulka, mis võib tuleneda probleemidest subühikute assambleerumisel. Selline sahharoosigradiendi profiil põhjendab ära ka oluliselt pikema lag-faasi ning aeglasema kasvukiiruse eksponentsiaalses faasis (joonis 18). $\Delta rluC$ ja $\Delta rlmE$ tüved on küllaltki sarnased MG1655 wt tüvele, kuid $\Delta rlmE$ tüve puhul on näha veidi suurenenud vabade subühikute hulk. Bügl et al. poolt tehtud sahharoosi gradiendi profiil (joonis 17) $\Delta rlmE$ tüvest ($ftsJ^-$) näitab $\Delta rluC \Delta rlmE$ mutandile sarnasemat partiklite jaotumist, kus

vabade 50S ja 30S subühikute osakaal on suurenenud ning 70S ribosoomide osakaal vähenenud (Bügl et al., 2000). Üks põhjus, miks antud bakalaureuse töö käigus saadud $\Delta rlmE$ tüve sahharoosi gradiendi profiil on teistsugune võib olla põhjustatud kompenseerivate mutatsioonide tekkest. Tan et al. on näidanud, et väikeste GTPaaside Obg ja EngA üleekspressioon taastab $\Delta rlmE$ mutanttüvel *wild type* fenotüübi ja ribosoomide sahharoosi gradiendi profiili (Tan et al., 2002). Väljaselgitamaks, kas $\Delta rluC \Delta rlmE$ mutandi fenotüüp on põhjustatud ainult *rlmE* geeni deletsioonist või süveneb kahe geeni puudumise koosmõjul või on seotud retsipienttüvega oleks vaja teha täiendavaid katseid, kus transduktsiooni geeniülekandes oleks doonortüveks MG1665 $\Delta rluC::Km$ ning retsipienttüveks MG1655 ($\Delta rlmE$).



Joonis 17. Polüsoomide profiil 10% - 50% sahharoosi gradiendis. Võrreldud on HB24 (wt) ja HB23 (*ftsJ*Δ567). HB23 tüvest on deleteeritud *ftsJ* ehk *rlmE* geen. (Bügl et al., 2000).



Joonis 18. Ribosoomide fraktsioneerimine 15% - 40% sahharoorosi gradiendis. Gradiendi kontsentratsioon muutub lineaarselt. Võrreldud on tüvede MG1655 wt, MG1655 ($\Delta rluC$), JW3146-2, MG1655 ($\Delta rluC$ $\Delta rlmE::Km$) MG1655 ($\Delta rluC$ $\Delta rlmKL$ $\Delta rluF$) ja MG1655 ($\Delta rluC$ $\Delta rlmKL$ $\Delta rlmN$ $\Delta rlmM$) fraktsioone.

Antud töös jäid vaatluse alt välja modifikatsiooniensüümid RluB, RluE ja RlmB, mis modifitseerivad nukleotiide vastavalt positsioonides U2605, U2457 ja G2251. Nendest modifikatsioonidest paigutuvad Green ja Nolleri poolt määratud 80 nukleotiidsesse piirkonda vaid RluE poolt katalüüsiv pseudouridiin Ψ2457. Samas modifikatsioon Gm2251 paikneb strateegiliselt olulises piirkonnas – P-lingus, mis on oluline peptidüül-tRNA seondumiseks.

Bakalaureusetöös saadud tulemustest võib järeldada, et kuigi enamus 23S rRNA domeeni V modifikatsioone ei pruugi olla *Escherichia coli* jaoks hädavajalikud, siis võib leida modifikatsioonide kombinatsioone, mille puudumise korral ei ole võimalik konstrueerida *E. coli* tüve. Selle kindlamaks tõestamiseks on tulevikus vaja konstrueerida *E. coli* tüvesid, milles puuduvad erinevates kombinatsioonides domeeni V modifikatsioonid. Lisaks võimalikule modifikatsioonide tähtsusele valgusünteesis võivad 23S rRNA modifikatsioonid olla seotud ka bakterirakkude omandatud kaitsemehhanismiga antibiootikumide vastu.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli konstrueerida *Escherichia coli* tüvi, milles puuduvad kõik 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid. Bakalaureuse töö käigus konstrueeriti *Escherichia coli* mutanttüvesid, kus puuduvad erinevates kombinatsioonides 23S rRNA domeeni V modifikatsioonid. Konstrueeritud tüvede fenotüüpide iseloomustamiseks uuriti bakterirakkude temperatuuritundlikkust, kasvuparameetreid ning analüüsiti ribosomaalset koostist sahharoosi gradiendis fraktsioneerimisega.

Üksikute modifikatsioonide puudumine domeenis V ei mõjuta ribosoomide funktsionaalsust ja bakterirakkude fenotüüpi. Siiski arvatakse, et võib leiduda kombinatsioone domeenis V asuvatest modifikatsioonidest, mille puudumisel ei ole ribosoom funktsionaalne. Sellise tüve loomisel võib eeldada, et bakterirakkude ribosoomid on väga haiged või rakud pole elujõulised. Antud töös jõuti sellise tüve loomisele lähemale. Modifikatsioonide olulisuse paremaks mõistmiseks ribosoomi funktsionaalsusele, oleks oluline jätkata *Escherichia coli* mutanttüvede loomisega, millest võimaluse korral puuduksid kõik domeeni V modifikatsioonid.

Töös tehtud analüüsi käigus leiti kombinatsioon modifikatsioonidest, mille puudumine ei avalda mõju rakkude kasvukiirusele ega temperatuuritundlikkusele. Samas konstrueeriti ka tüvi, millel esines tugev kasvudefekt, oli suurenenud vabade subühikute osakaal ning 70S ribosoomide hulk oli oluliselt vähenenud.

Esialgsete tulemuste põhjal võib arvata, et tõenäoliselt leidub kombinatsioon 23S rRNA domeeni V modifikatsioonidest, mille puhul ribosoomid on väga defektsed. Kui sellise tüve loomine on võimalik, siis suure tõenäosusega on sellel tüvel väga tugev kasvudefekt.

On the importance of modifications in *Escherichia coli* 23S rRNA domain V

Triin Truu

SUMMARY

Escherichia coli is one of the most used organisms for studying ribosomes and protein synthesis. In all domains of life ribosomal RNA contains modifications. 23S rRNA contains a number of modifications around domain V peptidyl transferase center (PTC). It has been noted that the absence of single modifications around that area has almost no effect on ribosomal maturation, function or cell growth (Del Campo et al., 2001; Lövgren and Wikström, 2001; Conrad et al., 1998). Only the absence of methyltransferase/heat-shock protein RlmE/FtsJ thus the absence of methylation of U2552 seems to be somewhat important for ribosomal assembly. Deletion of this enzyme leads to decrease in 70S ribosomes and increase of free subunits which explains defects in growth rate (Bügl et al., 2000).

The aim of this thesis was to construct an *Escherichia coli* strain that lacked all of the modifications located in the domain V of 23S rRNA. The experimenter was able to construct strains of *E. coli* lacking combinations of different domain V modifications. Some combinations have almost no effect on ribosomal profile in sucrose gradient, cell growth and temperature sensitivity while a strain lacking two modification enzymes *rluC* and *rlmE* showed severe growth defects and decrease in 70S ribosomes. Interestingly the constructed strain showed increased sensitivity to lower temperatures whereas the methyltransferase absent from the strain is also a heat shock protein. All of the strains constructed showed decrease in polysome profile.

Even though most modifications in the PTC area may not be essential for ribosome assembly they could contribute to bacterial defense mechanism against various antibiotics targeting PTC. In order to investigate further the importance of modifications in 23S rRNA domain V the experimenter needs to construct more strains varying combinations of deleted modification enzyme genes.

TÄNUSÕNAD

Autor tänab molekulaarbioloogia ja biokeemia labori meeldivat seltskonda. Eriline tänu kuulub juhendajale Aivar Liivile, professor Jaanus Remmele ja Margus Leppikule kannatlikkuse ja väärtuslike nõuannete eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Artiklid:

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 inframe, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2: 2006 0008.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 62: 293-300.

Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 277: 1453-1462.

Cherepanov, P. P. and Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene.* 158: 9-14.

Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 6640-6645.

Decatur, W., and Fournier, M. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 344-351. doi: 10.1016/S0968-0004(02)02109-6

Del Campo, M., Kaya, Y., and Ofengand, J. (2001). Identification and site of action of the remaining four putative pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(11), 1603-1615.

Dokudovskaya, S., Dontsova, O., Shpanchenko, O., Bogdanov, A., and Brimacombe, R. (1996). Loop IV of 5S ribosomal RNA has contacts both to domain II and to domain V of the 23S RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 2(2), 146-152.

Egebjerg, J., Leffers, H., Christensen, A., Andersen, H., and Garrett, R. A. (1987). Structure and accessibility of domain I of *Escherichia coli* 23 S RNA in free RNA, in the L24-RNA complex and in 50 S subunits: Implications for ribosomal assembly. *J Mol Biol*, 196(1), 125-136. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90515-8](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(87)90515-8)

- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., . . . Frank, J. (2003). Study of the Structural Dynamics of the E. coli 70S Ribosome Using Real-Space Refinement. *Cell*, 113(6), 789-801. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00427-6
- Ge, J., and Yu, Y.-T. (2013). RNA pseudouridylation: new insights into an old modification. *Trends in biochemical sciences*, 38(4), 210-218. doi: 10.1016/j.tibs.2013.01.002
- Green, R., and Noller, H. (1996). In vitro complementation analysis localizes 23S rRNA posttranscriptional modifications that are required for Escherichia coli 50S ribosomal subunit assembly and function. *RNA (New York, N.Y.)*, 2(10), 1011-1021.
- Grosjean, H. (2005). Modification and editing of RNA: historical overview and important facts to remember. In H. Grosjean (Ed.), *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing* (Vol. 12, pp. 1-22): Springer Berlin Heidelberg.
- Gutgsell, N., Deutscher, M., and Ofengand, J. (2005). The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in Escherichia coli. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(7), 1141-1152. doi: 10.1261/rna.2550105
- Hager, J., Staker, B. L., and Jakob, U. (2004). Substrate binding analysis of the 23S rRNA methyltransferase RrmJ. *J Bacteriol*, 186(19), 6634-6642. doi: 10.1128/jb.186.19.6634-6642.2004
- Hamma, T., and Ferré-D'Amaré, A. (2006). Pseudouridine synthases. *Chemistry and biology*, 13(11), 1125-1135. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.09.009
- Hansen, J., Ippolito, J., Ban, N., Nissen, P., Moore, P., and Steitz, T. (2002). The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Molecular cell*, 10(1), 117-128. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00570-1
- Harms, J., Schlutzenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., . . . Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*, 107(5), 679-688. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00546-3
- Havelund, J. F., Giessing, A. M. B., Hansen, T., Rasmussen, A., Scott, L. G., and Kirpekar, F. (2011). Identification of 5-Hydroxycytidine at Position 2501 Concludes Characterization of Modified Nucleotides in E. coli 23S rRNA. *J Mol Biol*, 411(3), 529-536. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.036>

- Helm, M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic acids research*, 34(2), 721-733. doi: 10.1093/nar/gkj471
- Huang, L., Ku, J., Pookanjanatavip, M., Gu, X., Wang, D., Greene, P., and Santi, D. (1998). Identification of two *Escherichia coli* pseudouridine synthases that show multisite specificity for 23S RNA. *Biochemistry*, 37(45), 15951-15957. doi: 10.1021/bi981002n
- Jean, S. S., Hsueh, P. R. (2011). Antimicrobial drug resistance in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 110(1):4-13. doi: 10.1016/S0929-6646(11)60002-8.
- Jiang, M., Sullivan, S., Walker, A., Strahler, J., Andrews, P., and Maddock, J. (2007). Identification of novel *Escherichia coli* ribosome-associated proteins using isobaric tags and multidimensional protein identification techniques. *Journal of bacteriology*, 189(9), 3434-3444. doi: 10.1128/JB.00090-07
- Johansen, S., Maus, C., Plikaytis, B., and Douthwaite, S. (2006). Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Molecular cell*, 23(2), 173-182. doi: 10.1016/j.molcel.2006.05.044
- Kaczanowska, M., and Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(3), 477-494. doi: 10.1128/MMBR.00013-07
- Kaya, Y., and Ofengand, J. (2003). A novel unanticipated type of pseudouridine synthase with homologs in bacteria, archaea, and eukarya. *Rna*, 9(6), 711-721.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., Jacobsen, L., Hansen, L., and Vester, B. (2005). A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol*, 57(4), 1064-1073. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04754.x
- Kim, D. F., and Green, R. (1999). Base-pairing between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal A site. *Mol Cell*, 4(5), 859-864.
- Kimura, S., Ikeuchi, Y., Kitahara, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., and Suzuki, T. (2012). Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity. *Nucleic acids research*, 40(9), 4071-4085. doi: 10.1093/nar/gkr1287

- King, T., Liu, B., McCully, R., and Fournier, M. (2003). Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Molecular cell*, 11(2), 425-435.
- Koonin, E. (1996). Pseudouridine synthases: four families of enzymes containing a putative uridine-binding motif also conserved in dUTPases and dCTP deaminases. *Nucleic acids research*, 24(12), 2411-2415. doi: 10.1093/nar/24.12.2411
- Kowalak, J., Bruenger, E., and McCloskey, J. (1995). Posttranscriptional modification of the central loop of domain V in *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA. *The Journal of biological chemistry*, 270(30), 17758-17764. doi: 10.1074/jbc.270.30.17758
- Lane, B. G., Ofengand, J., and Gray, M. W. (1992). Pseudouridine in the large-subunit (23 S-like) ribosomal RNA. The site of peptidyl transfer in the ribosome? *FEBS Lett*, 302(1), 1-4.
- Lazaro, E., Rodriguez-Fonseca, C., Porse, B., Urena, D., Garrett, R. A., and Ballesta, J. P. (1996). A sparsomycin-resistant mutant of *Halobacterium salinarum* lacks a modification at nucleotide U2603 in the peptidyl transferase centre of 23 S rRNA. *J Mol Biol*, 261(2), 231-238. doi: 10.1006/jmbi.1996.0455
- Leffers, H., Egebjerg, J., Andersen, A., Christensen, T., and Garrett, R. A. (1988). Domain VI of *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA: Structure, assembly and function. *J Mol Biol*, 204(3), 507-522. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90351-8](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(88)90351-8)
- Lesnyak, D. V., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., and Dontsova, O. A. (2006). Identification of *Escherichia coli* m2G methyltransferases: I. the ycbY gene encodes a methyltransferase specific for G2445 of the 23 S rRNA. *J Mol Biol*, 364(1), 20-25. doi: 10.1016/j.jmb.2006.09.009
- Liang, X.-h., Liu, Q., and Fournier, M. (2007). rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. *Molecular cell*, 28(6), 965-977. doi: 10.1016/j.molcel.2007.10.012
- Liang, X.-H., Liu, Q., and Fournier, M. (2009). Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(9), 1716-1728. doi: 10.1261/rna.1724409

- Liiv, A., Karitkina, D., Maiväli, Ü., Remme, J. (2005) Analysis of the function of E. coli 23S rRNA helix-loop 69 by mutagenesis. *BMC Molecular Biology*, 6:18. doi:10.1186/1471-2199-6-18
- Liu, M., and Douthwaite, S. (2002). Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 14658-14663. doi: 10.1073/pnas.232580599
- Łobocka, M. B. et al. (2004) Genome of Bacteriophage P1 *Journal Of Bacteriology*. 186, p. 7032–7068.
- Long, K., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., and Vester, B. (2006). The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(7), 2500-2505. doi: 10.1128/AAC.00131-06
- Lövgren, J., and Wikström, P. (2001). The rlmB gene is essential for formation of Gm2251 in 23S rRNA but not for ribosome maturation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183(23), 6957-6960. doi: 10.1128/JB.183.23.6957-6960.2001
- Maden, B. E. (1990). The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 39, 241-303.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural and molecular biology*, 19(6), 560-567. doi: 10.1038/nsmb.2313
- Moazed, D., and Noller, H. F. (1989). Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell*, 57(4), 585-597.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. and Smith, D. F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol*. 119: 736-747.
- Noller, H. F. ja Woese C. R (1981). Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science*. Vol. 212 no. 4493 pp. 403-411. DOI: 10.1126/science.6163215
- Noller, H.F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R.R., Kopylov, A.M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D.A., Gupta, R. and Woese, C.R. (1981). Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*. 9, 6167-6189.

- O'Connor, M., and Dahlberg, A. (1993). Mutations at U2555, a tRNA-protected base in 23S rRNA, affect translational fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(19), 9214-9218. doi: 10.1073/pnas.90.19.9214
- Ofengand, J., Malhotra, A., Remme, J., Gutsell, N. S., Del Campo, M., Jean-Charles, S., Kaya, Y. (2001). Pseudouridines and pseudouridine synthases of the ribosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 66, 147-159.
- Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., . . . Ochi, K. (2007). Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol*, 63(4), 1096-1106. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05585.x
- Petrov, A., Bernier, C., HersHKovits, E., Xue, Y., Waterbury, C., Hsiao, C., . . . Williams, L. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic acids research*, 41(15), 7522-7535. doi: 10.1093/nar/gkt513
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Gulen, B., Waterbury, C. C., HersHKovits, E., Hsiao, C., Harvey, S. C., Hud, N. V., Fox, G. E., Wartell, R. M., Williams, L. D. (2014). Secondary Structures of rRNAs from All Three Domains of Life. *PLoS One*, 9(2):e88222. doi: 10.1371/journal.pone.0088222
- Piekna-Przybylska, D., Przybylski, P., Baudin-Baillieu, A., Rousset, J.-P., and Fournier, M. (2008). Ribosome performance is enhanced by a rich cluster of pseudouridines in the A-site finger region of the large subunit. *The Journal of biological chemistry*, 283(38), 26026-26036. doi: 10.1074/jbc.M803049200
- Porse, B., and Garrett, R. (1999). Sites of interaction of streptogramin A and B antibiotics in the peptidyl transferase loop of 23 S rRNA and the synergism of their inhibitory mechanisms. *J Mol Biol*, 286(2), 375-387. doi: 10.1006/jmbi.1998.2509
- Punekar, A., Shepherd, T., Liljeruhm, J., Forster, A., and Selmer, M. (2012). Crystal structure of RlmM, the 2'O-ribose methyltransferase for C2498 of Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleic acids research*, 40(20), 10507-10520. doi: 10.1093/nar/gks727
- Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J., and Douthwaite, S. (2009). YgdE is the 2'-O-ribose methyltransferase RlmM specific for nucleotide C2498 in bacterial 23S rRNA. *Mol Microbiol*, 72(5), 1147-1158. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06709.x

- Raychaudhuri, S., Conrad, J., Hall, B., and Ofengand, J. (1998). A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*. *RNA* (New York, N.Y.), 4(11), 1407-1417. doi: 10.1017/S1355838298981146
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413(6858), 814-821. doi: 10.1038/35101544
- Schuwirth, B., Borovinskaya, M., Hau, C., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J., and Cate, J. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* (New York, N.Y.), 310(5749), 827-834. doi: 10.1126/science.1117230
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., and Cate, J. H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 310(5749), 827-834. doi: 10.1126/science.1117230
- Selmer, M., Dunham, C., Murphy, F., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A., . . . Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* (New York, N.Y.), 313(5795), 1935-1942. doi: 10.1126/science.1131127
- Sergiev, P., Golovina, A., Prokhorova, I., and Sergeeva..., O. (2011). Modifications of ribosomal RNA: From enzymes to function. *Ribosomes*.
- Siibak, T., and Remme, J. (2010). Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *RNA* (New York, N.Y.), 16(10), 2023-2032. doi: 10.1261/rna.2160010
- Sirum-Connolly, K., and Mason, T. L. (1993). Functional requirement of a site-specific ribose methylation in ribosomal RNA. *Science*, 262(5141), 1886-1889.
- Sivaraman, J., Iannuzzi, P., Cygler, M., Matte, A. (2004) Crystal structure of the RluD pseudouridine synthase catalytic module, an enzyme that modifies 23S rRNA and is essential for normal cell growth of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 335(1):87-101
- Spillmann, S., Dohme, F., and Nierhaus, K. H. (1977). Assembly in vitro of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes: proteins essential for the first heat-dependent conformational change. *J Mol Biol*, 115(3), 513-523.

- Sternberg, N. (1990) Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 87, pp. 103-107.
- Zengel, J. M., and Lindahl, L. (1993). Domain I of 23S rRNA competes with a paused transcription complex for ribosomal protein L4 of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 21(10), 2429-2435.
- Tan, J., Jakob, U., Bardwell, J.C. (2002). Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *J Bacteriol*. 184(10):2692-8.
- Thompson, J., and Cundliffe, E. (1980). Resistance to thiostrepton, siomycin, and sporangiomycin in actinomycetes that produce them. *Journal of bacteriology*, 142(2), 455-461.
- Toh, S. M., Xiong, L., Bae, T., and Mankin, A. (2008). The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(1), 98-106. doi: 10.1261/rna.814408
- Toh, S. M., and Mankin, A. S. (2008). An indigenous posttranscriptional modification in the ribosomal peptidyl transferase center confers resistance to an array of protein synthesis inhibitors. *J Mol Biol*, 380(4), 593-597. doi: 10.1016/j.jmb.2008.05.027
- Tu, D., Blaha, G., Moore, P., and Steitz, T. (2005). Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell*, 121(2), 257-270. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.005
- Vester, B. and Garrett, R. (1988). The importance of highly conserved nucleotides in the binding region of chloramphenicol at the peptidyl transfer centre of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *The EMBO journal*, 7(11), 3577-3587.
- Wang, K.-T., Desmolaize, B., Nan, J., Zhang, X.-W., Li, L.-F., Douthwaite, S., and Su, X.-D. (2012). Structure of the bifunctional methyltransferase YcbY (RlmKL) that adds the m⁷G2069 and m²G2445 modifications in *Escherichia coli* 23S rRNA. *Nucleic acids research*, 40(11), 5138-5148. doi: 10.1093/nar/gks160
- Wilson, D. and Nierhaus, K. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 40(5), 243-267. doi: 10.1080/10409230500256523

Wilson, D. and Nierhaus, K. (2007). The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 42(3), 187-219. doi: 10.1080/10409230701360843

Wimberly, B., Brodersen, D., Clemons, W., Morgan-Warren, R., Carter, A., Vornheim, C., . . . Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802), 327-339. doi: 10.1038/35030006

Wittmann, H. (1982). Structure and evolution of ribosomes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character*. Royal Society (Great Britain), 216(1203), 117-135. doi: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb09992.x

Yusupov, M., Yusupova, G., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T., Cate, J., and Noller, H. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5518), 883-896. doi: 10.1126/science.1060089

Raamatud:

Douthwaite, S.R., Fourmy, D. ja Yoshizawa, S. 2005. Nucleotide methylations in rRNA that confer resistance to ribosome-targeting antibiotics, p. 287-309. in H Grosjean (ed.), *Fine-tuning of RNA functions by modification and editing*. Springer, New York.

Ofengand, J ja Del Campo, M. 2004. Modified nucleosides in *Escherichia coli* ribosomal RNA, *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC. doi:10.1128/ecosal.4.6.1.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Liquid media for *E.coli*, p. A2.4. In J. Sambrook and D. W. Russell (ed.), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., vol.3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Vester, B. ja Long, K.S. 2009. Antibiotics resistance in bacteria caused by modified nucleosides in 23S ribosomal RNA. H Grosjean (ed.), *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*. p. 537-549. Plenum Publishing Co., N.Y.

LISAD

LISA 1

PCR produktide pikkused geeni deletsiooni tuvastamiseks.

Geen (nt)	Praimerid geeni otstest (nt)	Geen + praimerid (nt)	Δ geen + praimerid (nt)	Δ geen+ Km + praimerid (nt)
936	227+170= 397	1333	102+397= 499	1802
876	128+126= 254	1232	102+254= 356	1659
732	173+130= 303	1137	102+303= 405	1708
630	183+138= 321	1053	102+321= 423	1726
873	130+128= 258	1233	102+258= 360	1663
2109	130+128= 258	2369	102+258= 360	1663
1101	130+128= 258	1461	102+258= 360	1663
1155	128+130= 258	1515	102+258= 360	1663

Kanamütsiini resistentsuskasset: 1303 nt

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Triin Truu

(sünnikuupäev: 11.10.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „*Escherichia coli* 23S rRNA domeeni V modifikatsioonide tähtsusest“, mille juhendaja on Aivar Liiv, PhD,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.14